

Ekkehard Kuhn



Agrogentechnik und Biotechpflanzenproduktion

- Entwicklung, Stand und Zukunftspotential -



Der Verfasser, Jahrgang 1940, war von 1986 bis 2005 Professor am Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Hohenheim.

Vorwort

Pflanzen sind die Nahrungsgrundlage für Mensch und Tier und werden es bleiben. Was unverfälschte Natur zu bieten hat, konnte nie befriedigen, doch war ein langer, weit in die vorchristliche Zeit zurückreichender Weg zurückzulegen, um von essbaren Wildpflanzen und einfachen Landrassen zu den heutigen Hochleistungssorten bei Getreide, Soja, Raps und anderen zu gelangen. Auch heute ist das Potential der klassischen Pflanzenzüchtung noch keineswegs erschöpft. Genomsequenzierung, auf molekulare Marker gestützte Identifizierung züchterisch wertvoller Merkmale und andere früher unbekannte Methoden können Züchtungsprogramme vereinfachen und die Sortenentwicklung beschleunigen. Es bleibt aber eine prinzipielle Schranke, welche die konventionelle Pflanzenzüchtung von wenigen Ausnahmen abgesehen nicht überwinden kann: Sie kann die Artgrenzen nicht überspringen und bleibt auf die Nutzung des arteiligen Genvorrats angewiesen. Das änderte sich um 1985, als es erstmals gelang, bakterielle Gene in dafür gut geeignete Modellpflanzen wie den Tabak einzuführen und zwar so, dass sie „exprimiert“ wurden, d. h. ein funktionelles Proteinprodukt lieferten und sich stabil an die sexuellen Nachkommen dieser ersten transgenen Pflanzen vererbten. Zehn Jahre später begann der kommerzielle Anbau von herbizidresistentem und wenig später insektenresistentem Mais in den USA und Kanada. Es war die Geburtsstunde der Agrogentechnik. Heute werden transgene Kulturpflanzen dort, wo ihre prinzipiellen Gegner weniger Einfluss haben als hierzulande, auf mehr als 180 Millionen ha Ackerland angebaut. Mehr als eine Milliarde Menschen und ein Mehrfaches an Nutztieren haben sich bis heute von „Genpflanzen“ und daraus hergestellten Nahrungs- und Futtermitteln ernährt.

Der Grund für den Erfolg der neuen Technik liegt darin, dass sie messbare wirtschaftliche und ökologische Vorzüge hat, die sich in niedrigeren Umweltbelastungen, höheren Erträgen und deutlichen Einkommensverbesserungen der landwirtschaftlichen Betriebe niederschlagen. Während man die Vorteile der Agrogentechnik heute leicht erkennen kann, sind die ihr zugeschriebenen Risiken spekulativ geblieben. Es gibt weder zwingende theoretische Argumente noch praktische Erfahrungen, die dazu berechtigen, der gentechnischen Pflanzenzüchtung ein gegenüber traditionellen Verfahren größeres Gefahrenpotential zuzuschreiben. Ihre realisierbaren Anwendungen gehen über den gegenwärtig noch dominierenden Anbau herbizid- und insektenresistenter Ackerpflanzen weit hinaus. Sie umfassen Nahrungspflanzen mit erhöhter Krankheitsresistenz, verbesserter Trockentoleranz, besserer Verträglichkeit aus ihnen hergestellter Lebensmittel, ausgeglichenem Gehalt an Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen ebenso wie Industriepflanzen zur Produktion von Grund- und Wirkstoffen für die Chemie- und Pharmaindustrie. An diesen Entwicklungen arbeiten öffentliche und private Forschungseinrichtungen überall in der Welt. Der Mangel an nutzbarem Ackerland, Trinkwasser und sich abzeichnende Folgen des Klimawandels für die Landwirtschaft erzeugen einen wachsenden Druck zur möglichst wirkungsvollen Nutzung aller verfügbaren Ressourcen. Zwar kann die Agrogentechnik das Welternährungsproblem ebensowenig dauerhaft lösen wie irgendeine andere Technik, solange das exponentielle Wachstum der Erdbevölkerung nicht zum Stillstand kommt. Sie vermag aber die Folgen der Übervölkerung abzumildern; denn sie leistet einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Grundversorgung und zu einer effizienteren, die Naturvorräte schonenden Landwirtschaft. Die Verdrängung der konventionellen Sorten durch transgene wird deshalb weitergehen. Transgene Ackerpflanzen der ersten Generation, die überwiegend nur ein transgenes Merkmal tragen, werden gegenwärtig rasch durch modernere Stapelsorten ersetzt, die zwei oder mehrere Transgene exprimieren. Sie sind oft herbizidtolerant und gleichzeitig gegen alle wichtigen Schädlinge resistent, die in den jeweiligen Anbaubereichen vorkommen. Gleichzeitig kommen immer mehr Sorten auf den Markt, die nicht nur für die Produzenten Vorteile haben sondern auch ernährungsphysiologisch wertvoller sind als ihre konventionellen Vorläufer. Am Ende dieser Entwicklung werden die konventionellen Sorten auf dem Agrarweltmarkt kaum noch eine Rolle spielen.

Dieses Buch behandelt Geschichte, Methoden, Entwicklungsstand und Zukunftspotential der Agrogentechnik, beschreibt typische Vertreter dieses Kulturpflanzentyps und gibt anhand ausgewählter noch im Versuchsstadium stehender Prototypen einen Ausblick auf die kommende Entwicklung und ihre absehbaren Auswirkungen auf die Tier- und Pflanzenproduktion.

Titelbild: Im Hintergrund sieht man ein erntereifes Baumwollfeld (Quelle: USDA). Der Vordergrund zeigt den Entwicklungszyklus des Baumwollkapselbohrers, eines kleinen Schmetterlings, der von den Baumwollpflanzen lebt, und das Prinzip seiner gentechnischen Bekämpfung.

1	Überblick	1
1.1	Was sind Biotechpflanzen?	1
1.1.1	Transformation	1
1.1.1.1	Agrolistik	
1.1.1.2	Biolistik	
1.1.1.3	Genomeditierung	
1.1.2	Biotechpflanzen und Grüne Revolution	3
1.1.3	Biotechpflanzen der ersten Generation	3
1.1.4	Biotechpflanzen der zweiten Generation	4
1.1.4.1	Goldener Reis	
1.1.4.2	Multivitaminmais	
1.1.4.3	Weitere Beispiele	
1.2	Züchtungsziele	8
1.2.1	Stresstoleranz	9
1.2.1.1	Trockentoleranz	
1.2.1.2	Salz- und Aluminiumtoleranz	
1.2.1.3	Krankheitsresistenzen	
1.2.2	Qualitätsverbesserung	10
1.2.2.1	Bioverfügbarkeit von Phosphat und Eisen	
1.2.2.2	Verbesserung der Proteinqualität von Samenproteinen	
1.2.2.3	Entfernung von Allergenen bei Soja und Futtergräsern	
1.2.2.4	Qualitätsverbesserung des Sojaöls	
1.2.2.5	Entgiftung des Baumwollsamens	
1.2.3	Synthese neuer Inhaltsstoffe	12
1.2.3.1	Rekombinierte Proteine und VLP-Impfstoffe	
1.2.3.2	Essentielle Fettsäuren	
1.3	Energiepflanzen und Biotreibstoffe	16
1.3.1	Die Menschheit hat ein Energieproblem	16
1.3.2	Rentabilität energieliefernder Prozesse	18
1.3.3	Biodiesel und Bioethanol	20
1.3.3.1	Primärwirkungsgrad der Photosynthese	
1.3.3.2	Wirtschaftliche Rentabilität	
1.3.3.3	Energetische Rentabilität	
1.3.3.4	Produktionspotential	
1.3.3.5	Umweltverträglichkeit	
1.3.3.6	Wege zur Verbesserung der Rentabilität	
1.3.3.7	Zusammenfassung	
1.3.4	Kann Wind- und Sonnenstrom die Lücke füllen?	25
1.4	Zulassungspraxis und Biosicherheit	28
1.5	Die Antigentechnikbewegung - Ursprünge und Folgen	31
1.5.1	Geschichte	31
1.5.1.1	Die Asilomar-Konferenz über rekombinierte DNA	
1.5.1.2	Gentechnische Insulinproduktion bei Hoechst	
1.5.1.3	Die Amflora-Kartoffel der BASF	
1.5.1.4	So urteilen Gerichte	
1.5.1.5	Wer nichts weiß, muss alles glauben	
1.5.2	Folgen	35
1.5.2.1	Deutschland und Europa	
1.5.2.2	Entwicklungsländer	
1.5.3	Fazit	39
2	Grundlagen	40
2.1	Transformationstechnik	40
2.1.1	Regenerative Transformationsverfahren	41

2 Inhalt

2.1.1.1 Agrolistik	
2.1.1.2 Biolistik	
2.1.1.3 Gewebekultur und Regeneration	
2.1.1.4 Selektionsmarker	
2.1.1.5 Reportergene	
2.1.1.6 Promotertypen	
2.1.1.7 Gateway-Vektoren	
2.1.1.8 Plastidentransformation	
2.1.2 Nichtregenerative Transformationsverfahren	64
2.1.2.1 Blütentauchtransformation	
2.1.2.2 Ovarialtropftransformation	
2.2 Mutagenese	66
2.2.1 Chemische Mutagenese	66
2.2.2 T-DNA-Insertionsmutagenese	66
2.2.3 Chimäroplastie	66
2.3 Optimierung der Genexpression	68
2.3.1 Transkription, mRNA-Reifung und Translation	68
2.3.2 Genstrukturen	69
2.3.2.1 Prokaryontische Gene	
2.3.2.2 Eukaryontische Gene	
2.3.3 Optimierung der Promoterregion	72
2.3.3.1 Synthetische Promoter	
2.3.3.2 Chemisch induzierbare Promotersysteme zur Schädlingsbekämpfung	
2.3.4 Optimierung des kodierenden Genbereichs	76
2.3.4.1 Prokaryontische Gene	
2.3.4.2 Eukaryontische Gene	
2.4 Optimierung der Genfunktion	78
2.4.1 Proteine sind modulare Makromoleküle	78
2.4.2 Proteinkonstruktion	79
2.4.3 5-Enolpyruvat-3-Phosphatsynthase	79
2.4.4 Bt-Toxine	80
2.4.5 Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase	80
2.5 Selektive Genabschaltung durch posttranskriptionelle Genstillegung	83
2.5.1 Mechanismus	83
2.5.2 PTGS-vermittelte transgene Virusresistenzen	86
2.6 Entfernung von Selektionsmarkern	87
2.6.1 Virale Rekombinationssysteme	87
2.6.1.1 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem	
2.6.1.2 Das FLP/frt-System	
2.6.2 Markerentfernung bei nukleomtransformierten Pflanzen	88
2.6.2.1 Cre/loxP-Exzisionssysteme	
2.6.2.2 FLP/frt-Exzisionssysteme	
2.6.3 Markerentfernung bei Transplastomikern	91
2.6.3.1 Autonome homologe Rekombination	
2.6.3.2 Cre/loxP-Exzision	
2.6.3.3 Markereliminierung durch Kotransformation	
2.7 Genstapelung	93
2.7.1 Genstapelung durch Kreuzung monotransgener Linien	93
2.7.2 Multipler Gentransfer	93
2.8 Hybridenzüchtung und männliche Sterilität	94
2.8.1 Das Barnase/Barstar Sterilitätssystem	94
2.8.2 Das Barnase/Intein-Sterilitätssystem	95
2.8.2.1 Inteine	

2.8.2.2	Produktion von Hybridweizen mit dem Barnase/Intein-System	
3	Mais	103
3.1	Biologie	103
3.1.1	Morphologie	103
3.1.2	Stoffwechsel	104
3.1.3	Vermehrung	105
3.1.4	Systematik und Phylogenie	105
3.1.5	Hybridisierung, Auskreuzung, Genfluss	106
3.1.6	Unkräuter, Schädlinge und ihre Bekämpfung	106
3.1.6.1	Unkräuter und Herbizide	
3.1.6.2	Insektenschädlinge im Maisfeld	
3.1.7	Konventionelle Maiszüchtung	109
3.1.7.1	Allgemeine Züchtungsziele	
3.1.7.2	Züchtungsmethoden	
3.2	Maisproduktion und Verwertung der Ernte	112
3.2.1	Weltproduktion	112
3.2.2	Verwertung der Ernte	112
3.2.2.1	Mais als Tierfutter	
3.2.2.2	Mais zur menschlichen Ernährung	
3.2.2.3	Mais als Industriepflanze	
3.3	Biotechmais	115
3.3.1	Monotransgene Sorten	115
3.3.1.1	DKB-89790-5	
3.3.1.2	NK603	
3.3.1.3	EXP1910IT	
3.3.1.4	MON810	
3.3.1.5	MON863	
3.3.1.6	Event 3272 (SYN-E3272-5)	
3.3.1.7	LY038	
3.3.1.8	MON87460	
3.3.2	Oligotransgene Sorten (Stapelsorten)	122
3.3.2.1	LY038 x MON810	
3.3.2.2	MON863 x MON810 x NK603	
3.3.3	Weitere Beispiele	
3.4	Prototypen	125
3.4.1	Verbesserung der Anbauqualität	125
3.4.1.1	Schädlingsresistenzen	
3.4.1.2	Herbizidresistenzen	
3.4.1.3	Krankheitsresistenz	
3.4.1.4	Kältetoleranz	
3.4.1.5	Trockentoleranz	
3.4.1.6	Salztoleranz	
3.4.2	Verbesserung der Ernährungsqualität	130
3.4.2.1	Senkung des Phytinsäuregehalts des Korns	
3.4.2.2	Wege zur Verbesserung des Phosphatangebots	
3.4.2.3	Verbesserung der Proteinqualität	
3.4.3	Produktion bioaktiver Proteine und Peptide	134
3.4.3.1	Industrienzyme und Hormone	
3.4.3.2	Antigene	
3.4.3.3	Antikörper	
4	Raps	137
4.1	Biologie	137
4.1.1	Morphologie	137

4 Inhalt

4.1.2	Systematik und Phylogenie	138
4.1.3	Rapskrankheiten, Schädlinge und Unkräuter	138
4.1.4	Konventionelle Rapszüchtung	138
4.1.4.1	Null- und Doppelnul-Raps	
4.1.4.2	Canola	
4.1.4.3	Triazintoleranter Raps	
4.1.4.4	Imidazolinontoleranter Raps	
4.1.4.5	Sommer- und Winterraps	
4.2	Rapsproduktion	141
4.2.1	Produktions- und Ertragsvolumen	141
4.2.2	Sortenwahl	141
4.2.3	Aussaat, Kulturzeit und Ertrag	141
4.2.4	Fruchtfolge	142
4.3	Verwertung der Ernte	142
4.3.1	Stoffliche Verwertung	142
4.3.2	Energieraps	142
4.4	Biotechrops	144
4.4.1	Herbizidtolerante Sorten	144
4.4.1.1	MON-00073-7 (GT73, RT73)	
4.4.1.2	ACS-BN004-7 x ACS-BN001-4	
4.4.2	Sorten mit Stoffwechselmodifikationen	146
4.4.2.1	23-18-17 und 23-198	
4.4.3	Weitere Beispiele	147
4.5	Prototypen	149
4.5.1	Aluminiumtoleranz	149
4.5.1.1	Toxizität von Aluminium	
4.5.1.2	Ursachen der Aluminiumtoleranz	
4.5.1.3	Aluminiumtoleranter Raps	
4.5.2	Salztoleranz	149
4.5.2.1	Bodenversalzung und Pflanzenwachstum	
4.5.2.2	Salztoleranter Raps	
4.5.3	Steigerung des Ölgehalts der Rapssamen	151
4.5.4	Stoffwechselumbau beim Braunen Senf	151
4.5.4.1	Steigerung des Vitamin-E-Gehalts des Samenöls	
4.5.4.2	Erweiterung der Fettsäuresynthese im Samen	
5	Soja	155
5.1	Biologie	155
5.1.1	Morphologie	155
5.1.2	Stoffwechsel	156
5.1.3	Systematik, Phylogenie und Domestizierung	158
5.2	Sojaproduktion	159
5.2.1	Ansprüche an Klima und Boden	159
5.2.2	Anbau	159
5.2.3	Verwertung der Ernte	160
5.3	Biotechsoja	162
5.3.1	Herbizidresistente Sorten	162
5.3.1.1	GTS 40-3-2	
5.3.1.2	MON-89788-1 (MON-89788)	
5.3.1.3	A2704-12	
5.3.2	Insektenresistente Sorten	165
5.3.2.1	MON 87701	
5.3.3	Sorten mit ölsäurereichem Samenöl	166
5.3.3.1	G94-1, G94-19, G168	

5.4	Prototypen	169
5.4.1	Resistenzzüchtung	169
5.4.1.1	Herbizidresistenzen	
5.4.1.2	PTGS-induzierte Resistenz gegen das Gelbverzwergungsvirus	
5.4.2	Verbesserung der Samenqualität	171
5.4.2.1	Eliminierung allergener Samenproteine durch Genstillegung	
5.4.2.2	Verbesserung der Phosphatverfügbarkeit durch Senkung des Phytinsäuregehalts im Samen	
5.4.2.3	Steigerung des Vitamin-E-Gehalts des Sojaöls	
6	Zuckerrübe	176
6.1	Biologie	176
6.1.1	Morphologie und Wachstum	176
6.1.1.1	Vegetative Phase	
6.1.1.2	Generative Phase	
6.1.2	Taxonomie und Genetik	178
6.1.3	Unkräuter, Schädlinge und Krankheiten	179
6.1.4	Rübenzüchtung	179
6.2	Anbau und Ernte	181
6.2.1	Ansprüche an Boden und Klima	181
6.2.2	Aussaat und Keimung	181
6.2.3	Wachstum und Ernte	181
6.2.4	Weltproduktion	181
6.2.5	Verwertung der Ernte	182
6.3	Biotechzuckerrüben	183
6.3.1	GTSB77	
6.3.2	H7-1	
6.3.3	T120-7	
6.4	Prototypen	186
6.4.1	Synthese von Fructanen in der Zuckerrübe	186
6.4.1.1	Vorkommen und Funktionen der Fructane	
6.4.1.2	Struktur der Fructane	
6.4.1.3	Fructanbiosynthese	
6.4.1.4	Biotechnologie der Fructane	
6.4.2	Verbesserung der Salztoleranz	187
6.4.3	Resistenzzüchtung	188
6.4.3.1	Bekämpfung der Rhizomanie	
7	Baumwolle	192
7.1	Biologie	192
7.1.1	Morphologie	192
7.1.2	Systematik und Phylogenie	193
7.1.3	Baumwollschädlinge und -krankheiten	193
7.1.3.1	Schädlinge	
7.1.3.2	Baumwollkrankheiten	
7.2	Baumwollproduktion	195
7.2.1	Geschichte	195
7.2.2	Anbau	195
7.2.2.1	Aussaat und Keimung	
7.2.2.2	Wachstum und Ernte	
7.2.2.3	Ansprüche an Klima und Boden	
7.2.3	Weltproduktion	196
7.2.4	Verwertung der Ernte	197
7.2.4.1	Fasern	
7.2.4.2	Samen	

7.3	Biotechbaumwolle	198
7.3.1	Monotransgene Sorten	198
7.3.1.1	Bollgard (MON-531)	
7.3.1.2	LLCotton25	
7.3.2	Oligotransgene Sorten	199
7.3.2.1	Bollgard II (MON-15985-7)	
7.3.2.2	LLCotton25 x MON15985	
7.3.3	Weitere Beispiele	202
7.4	Prototypen	203
7.4.1	Erweiterung der Insektenresistenz	203
7.4.2	Stoffwechselmodifizierung	203
7.4.2.1	Entgiftung des Baumwollsamens durch Entfernung von Gossypol	
7.4.3	Verbesserung der Salz- und Trockentoleranz	205
7.4.3.1	Stimulierung des Ionen transports durch die Vakuolenmembran	
7.4.3.2	Stimulierung der Abscisinsäuresynthese	
7.4.4	Steigerung von Baumwollertrag und Faserqualität	206
7.4.4.1	Überexpression von Phytochrom B	
7.4.4.2	Stimulierung der Auxinsynthese	
8	Biologische Sicherheit	209
8.1	Unbedenklichkeit und Erntequalität von Biotechpflanzen	209
8.1.1	Grundlagen der Risikobewertung	209
8.1.1.1	Molekulargenetische Charakterisierung	
8.1.1.2	Vergleich von Probanden und Eltern	
8.1.1.3	Toxizität	
8.1.1.4	Allergenität	
8.1.1.5	Ernährungsqualität	
8.1.2	Eigenschaften verbreitet gebildeter Fremdproteine	211
8.1.2.1	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase	
8.1.2.2	Glyphosatoxidoreduktase	
8.1.2.3	Phosphinothricinacetyltransferase	
8.1.2.4	Neomycinphosphotransferase	
8.1.2.5	Dihydrodipicolinatsynthase	
8.1.2.6	Thioesterase	
8.1.2.7	α -Amylase und Phosphomannoseisomerase	
8.1.2.8	Barnase und Barstar	
8.1.2.9	Bt-Toxine	
8.1.3	Biochemische Analysen	216
8.1.3.1	Gesamtzusammensetzung	
8.1.3.2	Aminosäureprofile	
8.1.3.3	Fettsäureprofile	
8.1.3.4	Reservestoffe	
8.1.3.5	Nebenprodukte	
8.1.3.6	Antinutritiva, Toxine und Allergene	
8.1.4	Fütterungsstudien	218
8.1.4.1	Biotechsoja GTS-40-3-2	
8.1.4.2	Biotechmais MON863	
8.2	Umweltverträglichkeit des kommerziellen Biotechpflanzenanbaus	222
8.2.1	Grundlagen der Risikobewertung	222
8.2.2	Totalherbizide	222
8.2.2.1	Umweltverträglichkeit	
8.2.2.2	Resistenzentwicklung	
8.2.3	Pflanzliche Bt-Toxine	228
8.2.3.1	Umweltverträglichkeit	

8.2.3.2	Resistenzentwicklung	
8.2.3.3	Refugien	
8.2.3.4	Sekundärschädlinge und ihre Bekämpfung	
8.2.4	Unkrautpotential transgener und konventioneller Ackerpflanzen	232
8.2.4.1	Mais	
8.2.4.2	Zuckerrübe	
8.2.4.3	Soja	
8.2.4.4	Raps	
8.2.4.5	Baumwolle	
8.2.5	Übertragung aus Biotechpflanzen stammender Transgene auf andere Organismen	234
8.2.5.1	Mais	
8.2.5.2	Raps und Rapsverwandte	
8.2.5.3	Soja	
8.2.5.4	Baumwolle	
8.2.5.5	Zuckerrübe	
8.2.5.6	Andere Pflanzen	
8.2.5.7	Lässt sich der Genaustausch von Biotechpflanzen mit anderen Pflanzen verhindern?	
8.3	Schlussbemerkungen	240
9	Quellenverzeichnis	241

1 Überblick

1.1 Was sind Biotechpflanzen?

Biotechpflanzen sind Nutzpflanzen, deren Stammformen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden entwickelt wurden, welche nicht Bestandteil der klassischen Pflanzenzüchtung sind. Die bei weitem wichtigste dieser Methoden ist die Umwandlung einer normalen in eine transgene Pflanze durch Transformation. Dabei werden geeigneten Empfängerpflanzen mit Hilfe speziell für Pflanzen entwickelter Verfahren einzelne Erbanlagen (Gene) übertragen. Die Übertragung muss so erfolgen, dass die für die Pflanze neuen Gene stabil ins Erbgut eingebaut werden und in funktionsfähiger Form an ihre sexuellen Nachkommen weitergegeben werden können. Die Transformation gelingt nicht immer und ist bisher auch nicht bei allen Pflanzen möglich. Meist überträgt man nur eines oder zwei Gene, z. B. ein Gen, welches der Empfängerin eine Resistenz gegen ein bestimmtes Herbizid verleiht oder sie befähigt, eine vorher nicht gebildete biochemische Verbindung zu synthetisieren. Die übertragenen Gene können aus jedem beliebigen Organismus stammen, auch aus dem Genom des Menschen. Durch die Transformation wird der Pflanze ein neues, bei keinem ihrer Eltern vorhandenes, Erbmerkmal verliehen oder, was schwieriger ist, ein bei diesen vorhandenes Merkmal dauerhaft verändert oder ausgeschaltet. Dies ist ein grundlegender Unterschied zur Arbeitsweise der klassischen Pflanzenzüchtung.

Der Übersicht halber kann man transgene Pflanzen in zwei Gruppen unterteilen. Transgene Modellpflanzen verwendet man in der Grundlagenforschung. Bekannt ist ein kleines Ackerunkraut mit dem wissenschaftlichen Namen *Arabidopsis thaliana*, aber auch Tabak, Petunie, Tomate und mehrere andere. Die zweite Gruppe bilden transgene Rohstoff- und Nahrungspflanzen, die Biotechpflanzen. Wie die Tomate zeigt, kann eine transgene Pflanze beiden Gruppen angehören. Großflächig angebaut werden bisher vor allem Sojabohne, Baumwolle, Raps, Mais und Zuckerrübe. Biotechpflanzen nennt man auch GM-Pflanzen (gentechnisch modifiziert), GV-Pflanzen (gentechnisch verändert), GMOs (gentechnisch modifizierte) oder GVOs (gentechnisch veränderte) Organismen. Die Bezeichnung "Genpflanzen" ist irreführend, da sie suggeriert, Gene kämen im Pflanzenreich nur bei transgenen Pflanzen vor, was Meinungsumfragen zufolge auch viele Befragte aller Altersklassen glauben ([Gaskell u. a., 2005](#)).

1.1.1 Transformation

1.1.1.1 Agrolistik

Die beiden wichtigsten Verfahren zur Transformation von Pflanzen sind die Agrolistik und die Biolistik. Erstere nutzt die Fähigkeit mancher Agrobakterien, Bakteriengene in Pflanzen zu übertragen. Agrobakterien sind überwiegend harmlose Bodenbewohner, die sich von im Boden vorhandenen organischen Substanzen ernähren. Einige wenige Arten sind phytopathogen und erzeugen an den befallenen Pflanzen krebsartige Erkrankungen. Am bekanntesten ist *Agrobacterium tumefaciens*. Es ist der Verursacher der Wurzelhalsgallen. Das sind geschwulstartige Gewebewucherungen, welche von befallenen Pflanzen gebildet werden. Oft entstehen sie am Wurzelhals, der Stelle, wo die Hauptwurzel der Pflanze in den Spross übergeht. Einmal entstanden wachsen die Tumoren auch in Abwesenheit der Bakterien, weshalb schon früh vermutet wurde, dass die infizierten Pflanzen-gewebe von den Bakterien genetisch transformiert werden, was in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts experimentell bestätigt wurde. Agrobakterien sind die einzigen bekannten Organismen, die Gene zwischen verschiedenen Organismenreichen übertragen können. Seit etwa 1980 ist der Mechanismus der Tumorbildung im Wesentlichen bekannt. Krankheitserregende Agrobakterienstämme besitzen Gene, die gutartigen Stämmen und anderen Bakterienarten fehlen und die für die Tumorbildung nötigen Proteine kodieren. Diese Gene bilden die T-DNA (Transfer DNA) und liegen auf einem ca. 200 kbp (Kilobasenpaare) großen Plasmid, dem Ti-Plasmid (Tumor inducing). Sie sind von 2 kurzen Randsequenzen eingeschlossen. Für die Genübertragung sind nur die Randsequenzen erforderlich. Die Sequenz der zwischen diesen liegenden DNA spielt keine Rolle. Ersetzt man die Tumorgene durch Fremd-DNA, so lassen sich Bakterienstämme erhalten, welche zwar beliebige Gene in Pflanzen übertragen, aber keine Tumore mehr erzeugen können. Die Ti-Plasmide der heute zur Transformation verwendeten Stämme haben keine Tumorgene mehr. Damit ist sichergestellt, dass aus den transformierten Pflanzenzellen normale Pflanzen regeneriert werden können, welche die eingeführten Gene an ihre Nachkommen vererben. Gewöhnlich werden intakte einzelne oder einige wenige direkt hintereinander liegende T-DNA-Kopien an einer oder 2 zufälligen Positionen ins Pflanzengenom integriert. Die agrolistische Transformation ist heute die Methode der Wahl bei den meisten Pflanzenarten.

1.1.1.2 Biolistik

Die Biolistik ist die nach der Agrolistik verbreitetste Transformationsmethode. Ihr wichtigstes Einsatzgebiet ist die Transformation von Arten, welche der Infektion durch Agrobakterien widerstehen. Dies gilt für viele einkeimblättrige Pflanzen (Monokotylen), weshalb zur Transformation von Mais und anderen Getreidearten überwiegend die Biolistik eingesetzt wurde. Beim biolistischen (biologisch-ballistischen) Transformationsverfahren werden mikroskopisch kleine Gold- oder Wolframpartikel mit DNA beschichtet, in speziellen als "Genkanonen" bekannten Apparaturen explosionsartig beschleunigt und in Pflanzenzellen hineingeschossen. Im Zytoplasma der Zielzellen löst sich die DNA von den Metallpartikeln ab. Sie kann in den Zellkern gelangen und in die Chromosomen eingebaut werden. Die kinetische Energie der Mikroprojekteile ist so hoch, dass sie mehrere Zellschichten durchdringen können. Dennoch werden bei einem Beschussexperiment nur wenige Zellen des beschossenen Gewebestückchens getroffen, und auch bei diesen kommt es nur in wenigen Fällen zu einem stabilen Einbau der neuen Gene ins Pflanzengenom. Um transgene Pflanzen zu erhalten, arbeitet man deshalb wie bei der Agrolistik mit Zell- oder Gewebekulturen, aus denen sich komplette Pflanzen entwickeln können. Der apparative Aufwand ist verglichen mit der Agrolistik hoch, und die Transformationsraten sind relativ niedrig. Ferner neigt der Partikelbeschuss stärker als die Agrolistik dazu, komplexe genomische Integrationsmuster zu generieren, bei denen an verschiedenen genetischen Loci teils intakte, teils verstümmelte Transgenkopien in die pflanzlichen Chromosomen eingebaut sein können. Der Einbau mehrerer Kopien eines Transgens ins Genom des Wirts ist ein Nachteil, weil dies häufig keine stärkere Expression, sondern die Stilllegung des Gens bewirkt.

1.1.1.3 Genomeditierung

Bei den klassischen Transformationsverfahren wird die Fremd-DNA an zufälligen Positionen ins Genom der Empfängerpflanze eingebaut. Gezielte Genveränderungen, etwa zur Blockierung eines Stoffwechselwegs, dessen Endprodukt den Ernährungswert einer Ackerpflanze mindert oder die Heilung einer Erbkrankheit durch Korrektur des sie verursachenden Gendefekts, lassen sich so nicht erreichen. Zudem kann die Integration von Fremd-DNA ins Pflanzengenom die Expression pflanzeneigener Gene beeinflussen. Da der Integrationsort unbestimmt ist, kann der Einbau nicht vorhersagbare Veränderungen der morphologischen und physiologischen Eigenschaften der Pflanze bewirken. Aus diesen Gründen ist man seit langem bemüht, Transformationstechniken zu entwickeln, mit denen DNA-Sequenzveränderungen an definierten chromosomalen Positionen möglich sind. Die modernste Technik ist die Genomeditierung mit sequenzspezifischen künstlichen Nukleasen ([Gaj u. a., 2013](#)). Das sind Enzyme, welche eine bestimmte, nur ca. 20 Basenpaare lange DNA-Sequenz im Genom erkennen, binden und an dieser Stelle den DNA-Doppelstrang zerschneiden. Der Bruch wird durch zelleigene DNA-Reparaturenzyme wieder zusammengefügt. Dabei können Mutationen erzeugt und Gene eingefügt, entfernt oder ausgeschaltet werden. Einige Varianten dieser Verfahren führen nach gültigen gesetzlichen Definitionen nicht zu einem gentechnisch veränderten Organismus. Voraussetzung ist, dass nur wenige Basenpaare verändert wurden und die Veränderungen von spontanen oder bei der konventionellen Mutationszüchtung erzeugten Mutationen prinzipiell nicht unterscheidbar sind. Seit 2013 wird zur Genomeditierung zunehmend das CRISPR-Cas-System ([Bortesi & Fischer, 2015](#); [Liu & Fan, 2014](#)) verwendet, welches ursprünglich aus Bakterien stammt und diesen Immunität gegenüber Bakterienviren verleiht. CRISPR-Cas ist ein Zweikomponentensystem, welches nur aus einer Nuklease und einer kurzen einzelsträngigen RNA besteht. Letztere vermag die Nuklease an komplementäre Sequenzmotive in genomischer DNA zu lenken, worauf letztere von der Nuklease zerschnitten wird. Mit dem CRISPR-Cas-System lässt sich wie auch mit älteren Nukleasesystemen Doppelstrang-DNA sequenzspezifisch schneiden, um an dieser Stelle Mutationen zu erzeugen, neue Gene einzufügen, zu entfernen oder auszuschalten. Herstellung und Anwendung sind beim CRISPR-Cas-System weitaus einfacher und billiger als bei den älteren Verfahren, und so wird es diese wahrscheinlich bald verdrängen.

Bisher ist noch unklar, ob unter Verwendung von CRISPR-Cas gezüchtete Biotechpflanzen als gentechnisch veränderte Organismen im Sinne des deutschen Gentechnikgesetzes anzusehen sind. Wenn lediglich Punktmutationen in bekannten Genen gesetzt werden, wird man vermutlich zum selben Ergebnis kommen wie bei den anderen Nukleasesystemen und die Mutanten nicht als transgen einstufen. Die morphologischen und physiologischen Auswirkungen der durch Transformation oder Genomeditierung in einer Pflanze und in ihren Nachkommen hervorgerufenen DNA-Sequenzveränderungen hängen nicht davon ab, wie letztere entstanden sind. Auch gibt es keinen generellen Wirkungszusammenhang zwischen der Zahl der Insertionsstellen oder derjenigen der eingeführten, gelöscht oder ausgetauschten Nukleotide und dem Phänotyp. Schon eine einzige Punktmutation in einem lebenswichtigen Gen kann tödlich sein. Sie kann aber ebenso gut eine neue Herbizidresistenz

3 Überblick

erzeugen oder einen schweren Gendefekt beseitigen. Andererseits kann selbst die Insertion mehrere Kilobasen langer DNA-Fragmente ohne erkennbare Folgen bleiben, z. B., wenn darin vorhandene Gene unvollständig sind oder von Pflanzen verstandene Expressionssignale fehlen. Aus diesen Gründen sollten die Eigenschaften des Zuchtprodukts die Grundlage biologischer Sicherheitskonzepte bilden und nicht sein Herstellungsverfahren.

1.1.2 Biotechpflanzen und Grüne Revolution

Man kann den kommerziellen Biotechpflanzenanbau als zweite Phase der Grünen Revolution betrachten. Sie begann im Jahre 1945, als die amerikanische Rockefeller-Stiftung zusammen mit der mexikanischen Regierung ein Programm zur Steigerung der mexikanischen Agrarproduktion in Gang setzte. Maßgebend beteiligt war der amerikanische Agrarwissenschaftler und Pflanzenzüchter Norman Ernest Borlaug (*1914, †2009, Friedensnobelpreis 1970). Das Programm war so erfolgreich, dass Mexiko, welches vormals die Hälfte seines Weizens hatte importieren müssen, 1956 seinen Eigenbedarf selbst decken und 1964 500'000 t Weizen exportieren konnte. Von Indien, Pakistan und anderen Ländern wurde das Programm übernommen und unter Leitung der Weltbank und anderer internationaler Organisationen weitergeführt. Zwei wesentliche Elemente der Grünen Revolution waren einmal die Züchtung und Einführung ertragreicherer, widerstandsfähigerer und für mechanisierte Anbau- und Ernteverfahren geeigneter Getreidesorten, zum anderen die möglichst weitgehende Mechanisierung und Automatisierung der gesamten Agrarproduktion, der Aufbau von Bewässerungssystemen und die ausgiebige Verwendung von Mineraldünger und chemischen Pestiziden. Dies bewirkte eine enorme Steigerung der Ernteerträge in vielen Entwicklungsländern und leistete einen wesentlichen Beitrag zur Bekämpfung der Unterernährung in den Hungergebieten der Welt. Manchen Schätzungen zufolge hat die Grüne Revolution annähernd eine Milliarde Menschen vor dem Hungertod bewahrt ([Easterbrook, 1997](#)). Ohne die mit der Grünen Revolution in die Entwicklungsländer gebrachten und die moderne Landwirtschaft kennzeichnenden Produktionsmethoden ist die Grundversorgung der Bevölkerung angesichts der hohen Bevölkerungsdichte und der immer noch wachsenden Weltbevölkerung weder in den Industrie- noch in den Entwicklungsländern sicherzustellen. In letzteren hat sie, nicht anders als der wissenschaftlich-technische Fortschritt im Allgemeinen, tiefgreifende, nicht durchweg positive, wirtschaftliche, soziale und ökologische Veränderungen bewirkt. Manche ihrer heutigen Kritiker betrachten sie deshalb überwiegend als Fehlentwicklung.

Die zweite Phase der Grünen Revolution ist ein stiller, unaufhaltsamer Verdrängungsprozess, der in vielen Ländern zu beobachten ist und konventionelle Ackerpflanzen zunehmend durch Biotechpflanzen ersetzt. Seine Wurzeln gehen zurück auf das Jahr 1983, als es deutschen und ausländischen Wissenschaftlern erstmals gelang, transgene Pflanzen aufzuziehen, denen ein Bakterien entstammendes Kanamycinresistenzgen übertragen worden war und die daraufhin unempfindlich gegen das für viele Pflanzen giftige Antibiotikum waren ([De Block u. a., 1984](#); [Horsch u. a., 1984](#)). Sofort war damals den Beteiligten klar, welchen Durchbruch dies bedeutete und welche Chancen die erwachende Pflanzenbiotechnik für die Entwicklung einer umweltverträglicheren Agrarproduktion, die Verbesserung der Nahrungsmittelversorgung in den Hungergebieten der Welt und die Produktion nachwachsender Industrierohstoffe auf Pflanzenbasis bot. Inzwischen ist die Vision Wirklichkeit geworden. Auf rund 181 Millionen Hektar (Mha) Ackerfläche wurden 2014 von 18 Millionen Bauern in 28 Ländern Biotechpflanzen angebaut und haben mancherorts ihre konventionellen Vorgänger fast ganz ersetzt (Tab. 1).

1.1.3 Biotechpflanzen der ersten Generation

*Das Bessere ist des Guten Feind
Alte Volksweisheit*

Nichts zeigt das deutlicher als die jährliche Ausdehnung der Ackerflächen, auf denen in vielen Ländern der Welt Biotechpflanzen angebaut werden (Abb. 1, 2). Der kommerzielle Anbau begann 1996 und erzielte jahrelang Zuwachsraten von mehr als 10%. Auch in den armen Ländern der dritten Welt gehen immer mehr bäuerliche Betriebe dazu über, Biotechpflanzen anzubauen, welche die konventionellen Sorten rasch verdrängen. Die der Anbaufläche nach wichtigsten sind Soja, Mais, Baumwolle und Raps. Insektenresistenter Bt-Reis hat sich im Feldversuch bereits bewährt. Im September 2009 wurde in China die erste insektenresistente Biotechreisvarietät zum Anbau zugelassen ([James, 2015](#)). Die kommerzielle Massenproduktion sollte ursprünglich 2015 beginnen. Man erhoffte sich dadurch eine Verringerung des Pestizideinsatzes in den Reiskulturen um 80% bei gleichzeitiger Ertragsverbesserung um 8% ([Meyer, 2009](#); [James, 2015](#)). Dazu wird es vorerst nicht kommen, da die chinesische Regierung die auf 5 Jahre befristete Zulassung von Bt-Reis und Bt-Mais 2014 nicht verlängert hat. Die Hintergründe sind nicht bekannt ([Meyer, 2014](#)).

Die gegenwärtig für den kommerziellen Anbau zugelassenen Biotechpflanzen tragen ganz überwiegend transgene Herbizid- und Insektenresistenzen. Ihre Vorteile liegen im höheren Ernteertrag, niedrigeren Kosten für die Unkraut- und Schädlingsbekämpfung und einer wesentlich geringeren Pestizidbelastung der Umwelt und der in den Anbaugebieten lebenden und arbeitenden Bevölkerung. Es gibt einen starken Trend zur Entwicklung von Sorten, die zwei oder mehrere "gestapelte" Resistenzgene tragen. Diese hatten 2013 bereits einen Anteil von 27% an der globalen Biotechpflanzenproduktion ([James, 2015](#)). Stapelsorten sind gegen mehrere oder fast alle in den betreffenden Anbaugebieten wirtschaftlich bedeutenden Schädlinge resistent und/oder tragen kombinierte Resistenzen gegenüber Schädlingen und Total- oder Breitbandherbiziden. Man erhält sie bisher meistens durch

mehrfache Kreuzungen von Biotechsorten, welche jeweils nur ein neues Merkmal tragen. Ein Beispiel einer solchen Stapelsorte ist die in den Jahren 2007 und 2008 in Japan und den Philippinen zum Anbau zugelassene Biotechmaishybride BT11xMIR604xGA21 (Syngenta AG). Sie bildet 5 Fremdproteine. Vier davon verleihen der Sorte Resistenz gegen den Maiszünsler, den Maiswurzelbohrer und gegen die Totalherbizide Glyphosat und Glufosinat. Das fünfte bewirkt, dass Gewebekulturen dieser Sorte den Zucker Mannose als Kohlenstoffquelle verwerten können und kann die gewöhnlich zur Regeneration transgener Individuen benutzten Antibiotikaresistenzmarker ersetzen.

Rang	Land	Mha
1	USA	73,1
2	Brasilien	42,2
3	Argentinien	24,3
4	Indien	11,6
5	Kanada	11,6
6	China	3,9
7	Paraguay	3,9
8	Pakistan	2,9
9	Südafrika	2,7
10	Uruguay	1,6
übrige		3,7
Gesamtfläche		181,5

Tab. 1. Globaler Biotechpflanzenanbau 2014. Genannt sind die 10 bedeutendsten der insgesamt 28 Anbauländer ([James, 2015](#)).

1.1.4 Biotechpflanzen der zweiten Generation

Alles ist im Fluss
Heraklit

1.1.4.1 Goldener Reis

Nahezu die Hälfte der Weltbevölkerung leidet an Mangelerscheinungen und Krankheiten, die durch Mangel an Vitaminen und anderen lebensnotwendigen Nahrungsbestandteilen verursacht werden. In vielen Entwicklungsländern ernährt sich der größte Teil der Bevölkerung nahezu ausschließlich von Getreideprodukten, denen bestimmte Vitamine und essentielle Mineralstoffe fehlen. Im Getreidekorn entstehen diese Defizite dadurch, dass die erforderlichen Stoffwechselwege unvollständig oder unterdrückt sind oder fehlen. Konventionelle Züchtungsprogramme zur Vervollständigung der Nährstoffzusammensetzung haben bisher nur marginale Erfolge erzielt. Dagegen zeigen viele erfolgreiche Transformationsexperimente mit Modell- und Nutzpflanzen, dass eine gentechnische Optimierung des Pflanzenstoffwechsels möglich ist, indem Gene übertragen werden, welche die fehlenden Enzyme kodieren. Das erste Beispiel einer erfolgreichen gentechnischen Stoffwechselmodifizierung war der bekannte β -Carotin bildende Goldene Reis (Abb. 3), eine transgene Reissorte, deren Körner β -

Carotin, die Vorstufe von Vitamin A, enthalten. Im Speichergewebe des Reiskorns ist beim konventionellen weißen Reis kein Provitamin A enthalten. Wie viele andere Pflanzen bildet er Carotine nur in den grünen Pflanzenteilen. Goldener Reis I enthält ca. 1,6 Mikrogramm β -Carotin pro Gramm im Korn, der Nachfolger, der Goldene Reis II, bereits ca. 30 Mikrogramm pro Gramm. Man erreichte dies durch die Übertragung von zwei Genen des Carotinoidstoffwechsels in eine konventionelle Reissorte, von denen eines aus dem Mais, das zweite aus einem Bodenbakterium stammt ([Burkhardt u. a., 1997](#); [Paine u. a., 2005](#)). 72 g des polierten Goldenen Reis II reichen theoretisch aus, um den täglichen Vitamin-A-Bedarf von Kindern zu 50% zu decken. Vitamin-A-Mangel ist in Asien weit verbreitet und mit den armen Bevölkerungsschichten, für die Reis das Hauptnahrungsmittel bildet, korreliert. Er verstärkt die Anfälligkeit gegenüber infektiösen Kinderkrankheiten wie Masern und Durchfallerkrankungen und ist die wichtigste Ursache der Kinderblindheit in den Entwicklungsländern. Nach WHO-Schätzungen erblinden dort jährlich 250'000 - 500'000 Vorschulkinder infolge des Vitamin-A-Mangels, von denen die Hälfte innerhalb von 12 Monaten nach Eintritt der Erblindung stirbt. Um genug vollwertige Lebensmittel zu produzieren oder Vitaminkapseln flächendeckend zu verteilen, fehlen in diesen Ländern alle Voraussetzungen. Der Anbau geeigneter Standortvarianten des Goldenen Reis II könnte den Vitamin-A-Mangel mildern und eine der wichtigsten Mangelkrankheiten in mehr als 100 Ländern der Dritten

5 Überblick

Welt wirksam bekämpfen. Bisher wird Goldener Reis nur zu Versuchszwecken angebaut. Goldener Reis ist von einem Forscherteam unter Leitung des Schweizer Pflanzenzüchters Ingo Potrykus und seines deutschen

Kollegen Peter Beyer entwickelt worden. Das von den Entwicklern ins Leben gerufene Forschungsprojekt "Goldener Reis" ([Golden Rice, 2015](#)) verfolgt das Ziel, ernährungsphysiologisch vollwertige Reissorten zu züchten, welche den Tagesbedarf an Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen vollständig decken können. Nahrungspflanzen mit diesen Eigenschaften könnten nicht nur Mangelkrankheiten verhindern helfen. Sie könnten es eines Tages auch ermöglichen, die Fleischproduktion, soweit sie der Proteinversorgung wegen betrieben wird, zu verringern. Da die Nutztierhaltung weit mehr Ressourcen verbraucht und die Umwelt stärker belastet als der Ackerbau, wäre dies wünschenswert. Bis 2012, 12 Jahre nach seiner Entwicklung, hatte der Goldene Reis in keinem Land eine Zulassung als Nahrungspflanze erhalten. Da auf den Philippinen angesetzte über zwei Anbauzyklen laufende Feldversuche abgeschlossen sind, wird er voraussichtlich ab 2016 auf den Philippinen und danach

Anteil der Biotechsorten in % der Anbauflächen der USA 1996-2015
- Die angebauten Sorten sind teilweise herbizid- und insektenresistent -

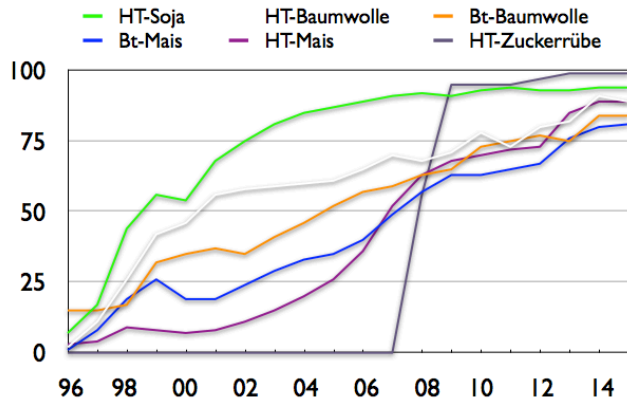


Abb. 1. Biotechpflanzenanbau in den USA ([USDA, 2016](#); [Transgen, 2016c](#)).

auch in Bangladesh, Indonesien und Vietnam verfügbar sein ([James, 2015](#)). Die wichtigste Ursache dieser Verzögerung sehen seine Entwickler in dem Aufwand, den die gegenwärtig in den Industrieländern geltenden und von den Entwicklungsländern übernommenen, in vielem nicht mehr zeitgemäßen, behördlichen Zulassungsvoraussetzungen erforderlich machen. Ein weiterer wesentlicher Grund für die Verzögerungen ist die massive Opposition global operierender Nichtregierungsorganisationen, die um die Glaubwürdigkeit ihrer Kampagnen fürchten müssen, falls sich der Goldene Reis im Feld und bei Ernährungsstudien bewährt und sich die auf ihn gesetzten Hoffnungen erfüllen.

Anteil der Biotechsorten in % der globalen Anbauflächen 1996-2014

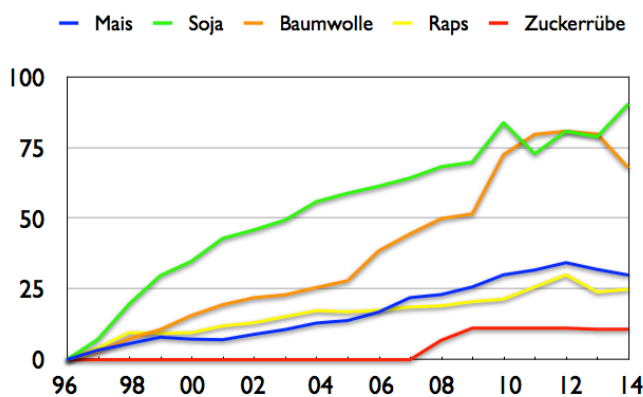


Abb. 2. Weltweiter Biotechpflanzenanbau 1996-2013 ([James, 2015](#); [FAOSTAT, 2016](#)).

1.1.4.2 Multivitaminmais

Weißer, nahezu carotinfreier Mais ist die im südlich der Sahara gelegenen (subsaharischen) Teil Afrikas vorwiegend gegessene Maisvarietät. Der in westlichen Ländern zur menschlichen Ernährung angebaute gelbe Mais dient dort meist als Tierfutter. Die Transformation einer südafrikanischen weißen Maisvarietät mit insgesamt 5 Genen, welche aus dem Mais, dem Reis und dem Darmbakterium *Escherichia coli* stammen, liefert transgene Maispopulationen, deren Körner erhebliche Mengen der (Pro-)Vitamine β -Carotin, Ascorbinsäure und Folsäure enthalten (Abb. 4). Ihre Körner sind tieforange gefärbt und enthalten 60 $\mu\text{g/g}$ β -Carotin, mehr als das 100-fache der nicht transgenen Ausgangssorte und etwa doppelt soviel wie der von [Paine u. a., \(2005\)](#) entwickelte Goldene Reis II. Der Gehalt an Ascorbinsäure ist sechsmal und ihr Folsäuregehalt doppelt so hoch wie bei der nicht transgenen Ausgangsform. Eine

typische Tagesration von 100 - 200 g der neuen Sorte genügt, um den empfohlenen Tagesbedarf von β -Carotin und Folsäure vollständig und den Bedarf an Vitamin C zu 20% zu decken.

In seiner stofflichen Zusammensetzung unterscheidet sich Multivitaminmais von nicht transgenen Kontrollpflanzen und dem Wildtyp nicht. Er bildet auch keine bekannten Toxine oder Allergene. Nach toxikologischen Standardprotokollen durchgeführte Fütterungsversuche mit Mäusen über 28 und 90 Tage lassen keine negativen Auswirkungen auf die Versuchstiere erkennen, und die mit einer mit Multivitaminmais angereicherten Diät gefütterten Mäuse gleichen anatomisch, histologisch und biochemisch den unbehandelten Kontrollgruppen ([Arjo' u. a., 2012](#)).



Abb. 3. Goldener Reis; ([Paine u. a., 2005](#). *Nature Biotechnology* 23, 482-487); nachbearbeitet; mit Genehmigung.

Nahrungspflanzen, welche mehrere Mikronährstoffe im richtigen Mengenverhältnis bilden, sind besonders wertvoll, weil sich dann mehrere Mangelkrankheiten mit nur einem Grundnahrungsmittel beheben lassen. Die gleichzeitige qualitative und quantitative Modifizierung mehrerer Stoffwechselwege in derselben Pflanze stößt zwar gegenwärtig noch an praktische Grenzen. Prinzipiell jedoch ist die Zahl der Gene, welche in einer Pflanze modifiziert oder in diese übertragen werden können, nicht begrenzt, und auch ihr Expressionsniveau lässt sich

theoretisch in weiten Grenzen variieren. Weiterentwicklungen in dieser Richtung werden es wahrscheinlich eines Tages ermöglichen, transgene Getreidesorten anzubauen, deren Mehl alle essentiellen Nährstoffe im richtigen Mengenverhältnis enthält und Zusätze entbehrlich machen.

1.1.4.3 Weitere Beispiele

Biotechmais LY38 ist ein Beispiel einer transgenen Maissorte, bei welcher der Anteil der Aminosäure Lysin im Maiskorn erhöht und dadurch die Aminosäurezusammensetzung verbessert wurde. Maisproteine haben nur einen geringen Lysingehalt, zu wenig, um die Eiweißversorgung mit Mais und Maisprodukten gefütterter Haustiere sicherzustellen. Durch Expression eines Enzyms des Lysinstoffwechsels von *Corynebacterium glutamicum* kann die Lysinkonzentration im Maiskorn wesentlich gesteigert werden, wodurch der Lysinmangel der Maisfuttermittel ausgeglichen werden kann. LY038 ist zur Verwendung als Tierfutter gedacht, vorwiegend in der Geflügel- und Schweinezucht, um die übliche Ergänzung des Futters mit Lysinverbindungen entbehrlich zu machen. Zugelassen ist die Sorte seit 2006 in den USA und Kanada, seit 2007 auch in Japan.

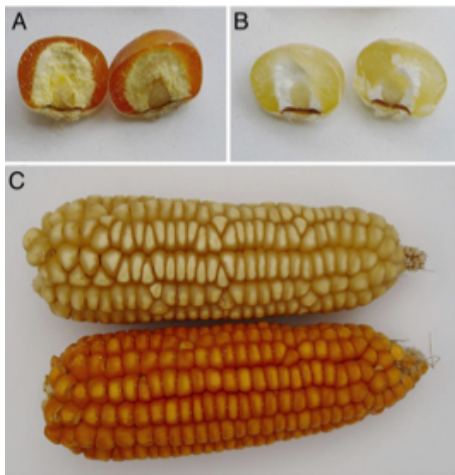


Abb. 4. Carotinhäufung im transgenen M37W-Multivitaminmais; orange-gelber (A) und weißlich-gelber (B) Phänotyp transgener und gewöhnlicher M37W-Maiskörner; C Kolben von transgenem Multivitaminmais und konventionellem weißem Mais ([Naqvi u. a., 2009](#): PNAS 106:7762–7767).

Bereits seit 1997 sind Biotechsojalinien auf dem Markt, welche eine genetische Modifikation des Fettsäurestoffwechsels tragen. Sie bewirkt, dass ein zur Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren notwendiges Enzym des Fettsäurestoffwechsels im Samen nicht mehr gebildet werden kann. Diese Genabschaltung verhindert die Synthese von Linsäure und längerketigen Fettsäuren aus Ölsäure, was zur Anreicherung von Ölsäure im Samen führt. Manche dieser Sorten liefern ein Öl, das zu über 80% aus Ölsäure besteht, verglichen mit nur 23% bei normalen Sojabohnen. Der Ölsäureanteil ist damit höher als beim Raps- und Olivenöl. Gleichzeitig ist der Gehalt an gesättigten Fettsäuren um ca. 30% niedriger als beim normalen Sojaöl. Ölsäureangereichertes Sojaöl enthält auch keine Transfettsäuren mehr und bleibt bei Zimmertemperatur flüssig. Es ist ein hochstabiles Pflanzenöl, welches ohne vorausgegangene Härtung zum Frittieren und zur Herstellung von Schmiermitteln auf Pflanzenbasis verwendet werden kann. Insgesamt stellen diese Veränderungen eine wesentliche Verbesserung der Ernährungs- und Verarbeitungsqualität des Sojaöls dar.

Neben Mais, Raps, Soja und Baumwolle gibt es zahlreiche weitere Arten, bei denen Biotechvarietäten zum Anbau zugelassen sind (Tab. 2).

Nicht alle werden kommerziell genutzt, und wo dies geschieht, ist ihre wirtschaftliche Bedeutung bisher noch relativ gering. Eine herbizidtolerante Form der Luzerne (Alfalfa, *Medicago sativa*), einer wichtigen Futterpflanze, welche in den USA nach Anbaufläche hinter Mais, Soja und Weizen den vierten Platz einnimmt, wurde 2011 - 2012 in den USA auf 425'000 ha angebaut. Luzerne ist mehrjährig, ca. 25% der Flächen werden

7 Überblick

jährlich neu gesät. Man geht davon aus, dass in etwa 10 Jahren der gesamte Bestand in den USA transgen sein wird. Beim Zuckerrohr, welches 80% der Weltzuckerproduktion liefert, ist die Entwicklung anbaufähiger transgener Varietäten in mehreren Ländern bereits weit fortgeschritten.

1.2 Züchtungsziele

Sowohl bei den vier Hauptvertretern als auch bei anderen Kulturpflanzen existieren zahlreiche transgene Prototypen, bei denen einzelne agronomische Leistungsmerkmale verbessert wurden (Tab. 3). Wichtige Züchtungsziele sind Stresstoleranz und die dadurch möglichen Ertragsverbesserungen, Qualitätsverbesserung der geernteten Pflanzenteile und die Synthese neuer oder besser verwertbarer Inhaltsstoffe.

Pflanze	neues oder verbessertes Merkmal	Mechanismus
Mais (<i>Zea mays</i>)	Trockentoleranz	Expression eines Kälteschockproteins aus <i>Bacillus subtilis</i>
	Bioverfügbarkeit von Phosphat und Eisen	Expression rekombinierter Phytase- und Ferritingene im Samen
	Proteinqualität	Expression eines lysinreichen Pollenproteins einer Wildkartoffel
	aktive orale Schutzimpfung	Expression viraler und bakterieller Antigene im Maiskorn
Raps (<i>Brassica napus</i>)	Aluminiumtoleranz	Expression einer mitochondrialen Citratsynthase der Ackerschmalwand
	Salztoleranz	Expression eines Membrantransportproteins der Ackerschmalwand
Soja (<i>Glycine max</i>)	Virusresistenz	Stimulation der Virusabwehr durch Genstilllegung
	Allergenität	Entfernung eines immundominanten Sojaallergens durch Genstilllegung
	Bioverfügbarkeit von Phosphat	Samenspezifische Expression rekombinierter bakterieller Phytasegene
	Steigerung des Vitamin-E-Gehalts des Samenöls	Expression eines Gens der Fettsäuresynthese einer asiatischen Ölpflanze
Baumwolle (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Entgiftung des Samens durch Entfernung von Gossypol	Unterbrechung der Terpenoidsynthese im Samen durch Genstilllegung
	Trockentoleranz	Expression von Ionentransportern, ATPasen oder Pyrophosphatasen der Ackerschmalwand oder der verwandten Salzkresse
Weidelgras (<i>Lolium rigidum</i>)	Allergenität	Entfernung eines immundominanten Pollenallergens durch Genstilllegung
Tab. 3. Beispiele transgener Kulturpflanzen mit neuen oder verbesserten Leistungsmerkmalen. Die Anwendungsreife dieser Entwicklungen ist unterschiedlich. Eine trockentolerante Maislinie ist seit 2010/2011 in den USA und Kanada zum Anbau zugelassen. Die Entwicklung marktfähiger salztoleranter Rapslinien oder für Allergiker geeigneter Sojabohnen wird wesentlich länger dauern.		

1.2.1 Stresstoleranz

Man unterscheidet abiotische und biotische Stressfaktoren. Zu ersteren gehören Trockenheit, zu hohe oder zu niedrige Temperaturen, Bodenversalzung und Bodenversauerung. Biotische Stressfaktoren sind Schädlinge, Unkräuter und Krankheitserreger, insbesondere Pilze und Viren.

1.2.1.1 Trockentoleranz

Die Landwirtschaft verbraucht über 70% der weltweit genutzten Süßwasservorräte. Während der Mensch pro Tag nur 1-2 l trinkt, verbraucht die für eine Tagesration erforderliche Tier- und Pflanzenproduktion 2000 - 3000 l. In Ländern wie China sinken die Grundwasserspiegel schnell. Beim Mais schützt man die globalen Ertrags-einbußen, die durch Wassermangel jährlich verursacht werden, auf ca. 15%. Ein Viertel der Verluste kann vermutlich durch die Entwicklung trocken-toleranterer Sorten ausgeglichen werden, der Rest nur durch wasser-sparende Anbaumethoden und künstliche Bewässerung. 2010/2011 ist in den USA und Kanada eine trocken-tolerante Biotechmaisvarietät zum Anbau zugelassen worden. Die Trockentoleranz beruht auf der Bildung eines aus *Bacillus subtilis* stammenden Transproteins (Cera, 2015). Etwa ab 2017 könnte eine trocken-tolerante Varietät für den Anbau in der Sahelzone verfügbar sein (James, 2015). Baumwolle benötigt zu optimalem Wachstum ebenfalls eine gute Wasserversorgung, was in vielen Anbaugebieten künstliche Bewässerung notwendig macht. Auch bei Baumwolle kennt man Biotechvarietäten mit verbesserter Trockentoleranz. Sie bilden eine Pyro-phosphatase, welche aus der mit der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) verwandten Salzkresse (*Thellungiella halophila*) stammt und bei der Aufrechterhaltung des Ionenleichgewichts im Zellplasma eine Rolle spielt.

1.2.1.2 Salz- und Aluminiumtoleranz

Die landwirtschaftliche Produktivität ist auf versalzten Böden stark beeinträchtigt. Weltweit sind mehr als 60 Mha Ackerland von der Bodenversalzung betroffen. Beim Raps konnte man zeigen, dass Individuen, welche ein aus der Ackerschmalwand stammendes Ionentransportprotein (AtNHX1) exprimieren, noch bei einer Natriumchloridkonzentration von 200 mM wachsen können. Das Wachstum von gewöhnlichem Raps ist bei dieser Konzentration schwer beeinträchtigt, und dies gilt auch für die meisten anderen Ackerpflanzen. Je stärker der Transporter in den Rapspflanzen exprimiert wird, desto höher ist ihre Salztoleranz. Phänotypisch unterscheiden sich bei hoher Salzkonzentration wachsende transgene Rapspflanzen vom Wildtyp kaum. Diese salztoleranten transgenen Rapspflanzen sind insofern interessant, als sie zeigen, dass die gezielte Übertragung eines einzigen neuen Merkmals die Salztoleranz einer Kulturpflanze ohne erkennbare Beeinträchtigung anderer Eigenschaften signifikant verbessern kann. Da dies nur gentechnisch möglich ist, liefern salztolerante transgene Pflanzen auch überzeugende Beispiele für das Entwicklungspotential einer modernen, gentechnische Verfahren einschließenden Pflanzenzüchtung.

Unter sauren Bedingungen werden im Boden aus Aluminiumsilikaten dreiwertige Aluminiumionen (Al^{3+}) freigesetzt, die für viele Pflanzen stark toxisch wirken. Da saure Ackerböden 30 - 40% der ackerbaulich nutzbaren Landfläche der Erde ausmachen, stellt dies eine schwerwiegende Beeinträchtigung des Anbaus vieler Kulturpflanzen dar. Bei *Arabidopsis*, Raps und manchen anderen Pflanzen kann die Aluminiumtoleranz durch Überexpression bestimmter Enzyme des Energiestoffwechsels verbessert werden. Allerdings sind diese Entwicklungen von der Anwendungsreife noch weit entfernt.

1.2.1.3 Krankheitsresistenzen

Virusresistenz

Alle Kulturpflanzen können von Krankheitserregern wie Pilzen, Viren und Bakterien befallen werden. Wenn keine wirksame Bekämpfung durchgeführt wird, kann der Befall so stark werden, dass die gesamte Ernte verloren geht. Pathogenese und Pathogenabwehr sind komplexe biochemische Mechanismen, welche keineswegs in allen Einzelheiten verstanden sind. Am weitesten gediehen ist die Etablierung transgener Virusresistenzen. Virusresistente Biotechpflanzen kennt man seit den Anfängen der Kommerzialisierung. So gibt es transgene Kartoffeln, die ein Hüllprotein des Kartoffel-X-Virus (PVX) oder Kartoffel-Y-Virus (PVY) exprimieren. 1996 wurde eine Papayasorte zugelassen, die das Hüllprotein des Papaya-Ring-Spot-Virus (PRSV) bildet und resistent gegen das Virus ist. Eine im Jahre 2007 in den USA für den Freilandanbau zugelassene Pflaumensorte ist resistent gegen die Pflaumenpocken. Sie bildet ebenfalls ein virales Hüllprotein. Auch bei Mais, Raps und Soja befinden sich virusresistente Sorten in der Entwicklung. In all diesen Fällen beruht die Resistenz auf der Aktivierung der posttranskriptionellen Genstilllegung (PTGS). Das ist ein

Abwehrmechanismus, mit dem sich Pflanzen bis zu einem gewissen Grad gegen eindringende Viren verteidigen können. Resistente Linien exprimieren ein Gen, welches aus dem Genom des befallenden Virus stammt. Wird das Gen abgelesen (transkribiert), so wird die gebildete RNA vom PTGS-Mechanismus als fremd erkannt und enzymatisch abgebaut, bevor sie in ein Protein übersetzt werden kann. Dasselbe geschieht mit der Erbinformation eines Virus, welches in eine Pflanzenzelle eingedrungen ist. Die Virusvermehrung wird dadurch unterbunden.

Pilzresistenz

Im Jahre 2012 wurden in Deutschland, größtenteils von beruflichen Verwendern, 9'066 t Fungizide zur Bekämpfung phytopathogener Pilze eingesetzt. 38'200 t wurden exportiert ([BVL, 2012](#)). Am gefährlichsten sind Pilze der Gattung *Fusarium*, vor allem *F. graminearum* und *F. sporotricoides*, welche die Verrottung der Maiskolben bzw. die Ährenfusariose des Weizens verursachen. Die Pilze bilden eine große Zahl mehr oder weniger giftiger Stoffwechselprodukte. Letztere entstehen auch nach der Ernte, wenn infiziertes Getreide gelagert wird. Pilzgifte (Mykotoxine) können die menschliche Gesundheit gefährden, wenn sie in die Nahrungskette gelangen und Lebererkrankungen sowie Krebs hervorrufen. Durch mit Pilzen und ihren Mykotoxinen kontaminiertes Getreide entstehen Jahr für Jahr Millionenverluste. Bis heute gibt es kein Fungizid, welches gegen die *Fusarium*-arten ausreichenden Schutz bietet. Es sind mehrere gentechnische Verfahren in der Erprobung, die das Ziel haben, Getreide vor Pilzinfektionen zu schützen. Eines davon ist die Expression rekombinierter (gentechnisch modifizierter) Antikörper in Pflanzen. Das Immunsystem von Hühnern vermag Antikörper zu bilden, welche spezifische Antigene auf der Oberfläche der Pilzfäden einzelner *Fusarium*-arten erkennen können. Koppelt man den Antikörper mit einem fungiziden Peptid, so hemmt er das Pilzwachstum im Reagenzglasversuch (*in vitro*). Dasselbe geschieht, wenn die rekombinierte DNA, welche aus der Gensequenz des Antikörpers und derjenigen des Peptids besteht, in eine Pflanze übertragen wird. Transgener Weizen, welcher dieses Fusionsprotein exprimiert, ist gegen *Fusarium*-infektionen geschützt. Auch die Expression von Chitinasen, welche die Zellwände der Pilzfäden, nicht aber Pflanzenzellen, angreifen, vermag die Pilzresistenz von Getreidearten zu verbessern. Die Marktreife dieser Verfahren ist bisher nicht erreicht ([Shin u. a., 2008](#)).

1.2.2 Qualitätsverbesserung

1.2.2.1 Bioverfügbarkeit von Phosphat und Eisen

Der an sich für die menschliche und tierische Ernährung ausreichende Phosphorgehalt von Getreide und Ölsaaten ist größtenteils in Phytinsäure gebunden. Phytinsäure (Inositolhexakisphosphat) ist der Hexaphosphorsäureester des Inositols (Cyclohexanhexols), eines sechswertigen zyklischen Alkohols. Rinder und andere Wiederkäuer können die Phytinsäure nutzen. Nicht wiederkäuende Nutztiere scheiden mit der Nahrung aufgenommene Phytinsäure unverdaut wieder aus. Dies ist der Grund dafür, dass Gülle vom Schwein und anderen Haustieren soviel Phosphat enthält. Die unverdaut ausgeschiedene Phytinsäure wird als Hauptquelle der Phosphatverschmutzung und Eutrophierung der Gewässer durch die Landwirtschaft angesehen.

Um die Nahrungsansprüche von Schweinen und Geflügel zu befriedigen, ergänzt man Tierfutter oft entweder mit Phosphat, das aus Gesteinsmehl stammt oder durch Zugabe von Phytase, eines Phytinsäure zerlegenden Enzyms aus Mikroorganismen. Da die Supplementierung kostspielig ist, wird versucht, das Problem an der Wurzel anzupacken, indem man Pflanzen züchtet, deren Samen einen möglichst niedrigen Phytinsäuregehalt haben. Dabei sind gegenwärtig vor allem zwei Ansätze erkennbar: die Expression rekombinierter Phytasegene in den Keimblättern des Embryos und die Stilllegung von Genen, welche zur Synthese oder Speicherung der Phytinsäure erforderliche Enzyme oder Transportproteine kodieren.

Transgene Sojapflanzen, deren Samen eine bakterielle Phytase exprimieren, können im Samen so viel Phytase bilden, dass die Phytinsäure nahezu quantitativ in Phosphat und Inositol umgewandelt wird. Es gibt ferner transgene Maispflanzen, welche die Phytase eines Schimmelpilzes exprimieren, entweder ausschließlich oder in Kombination mit dem Eisen bindenden Protein Ferritin. In aus Körnern dieser Pflanzen hergestelltem Maismehl sind bis zu 95% der Phytinsäure abgebaut, wodurch der Phosphor bioverfügbar wird. Maispflanzen, welche zusätzlich das Eisen bindende Protein Ferritin im Korn bilden, haben zudem einen wesentlich höheren Eisengehalt. Die Expression rekombinierter Phytase- und Ferritingene in transgenem Mais könnte somit genutzt werden, um Phosphat- und Eisenmangel, wie er bei vegetarischer Ernährung leicht auftreten kann, vorzubeugen. In China, wo 500 Mio. Schweine (50% des Weltbestands) und 13 Mrd. Hühner und anderes Geflügel gehalten

werden, ist ein im Land entwickelter Phytase-Biotechmais zum Anbau zugelassen und steht kurz vor der Markteinführung ([James, 2015](#)).

1.2.2.2 Verbesserung der Proteinqualität von Samenproteinen

Wie die bereits vermarktete Sorte LY038 zeigt, kann der Lysinmangel des Maiskorns durch Eingriffe in die Regulation der Lysinsynthese verringert werden. Davon abgesehen werden noch weitere Möglichkeiten untersucht. Ein Gen einer in Bolivien beheimateten Wildkartoffel kodiert ein pollenspezifisches Protein mit besonders hohem Lysingehalt. Wird es in den Mais eingeführt, so erhält man ein Korn, in dem der Lysingehalt um 16% - 55% erhöht ist. Im Gegensatz zu LY038 wird hier nicht der Gehalt an freiem Lysin erhöht, sondern der des proteingebundenen Lysins bei gleichzeitiger Steigerung des Proteinanteils im Korn.

1.2.2.3 Entfernung von Allergenen bei Soja und Futtergräsern

Ein signifikanter Teil der Bevölkerung reagiert allergisch auf bestimmte Lebensmittel. Die Allergene der Sojabohne sind insofern besonders problematisch, als Sojaprodukte wegen des hohen Ernährungswerts der Sojaproteine in der Lebensmittelproduktion zunehmende Verbreitung gefunden haben. Dies führt dazu, dass es für Sojaallergiker immer schwieriger wird, sojafreie Lebensmittelprodukte zu bekommen. Auch bei Schweinen und Kälbern findet man Sojaallergien. Lebensmittelallergene sind fast immer natürlich vorkommende Proteine. Eines der allergenen Samenproteine der Sojabohne trägt die Bezeichnung Gly-m-Bd-30-K. Es macht etwa 1% des Gesamtproteins des Samens aus. Auf dieses Protein reagieren mehr als 65% der Sojaallergiker. Es ist möglich, das Gen dieses Proteins stillzulegen und Sojalinien zu entwickeln, die dieses Allergen nicht mehr enthalten.

Die Eliminierung immundominanter Allergene ist auch bei anderen Pflanzen möglich. Die Expression des wichtigsten Proteinallergens des Weidelgrases (*Lolium spec.*), eines der verbreitetsten Weidegräser mit stark allergenem Pollen, kann unterdrückt werden, ohne Vitalität oder Nutzwert der Pflanze zu beeinträchtigen. Andererseits ist kein Fall bekannt geworden, wo eine Biotechpflanze ein in ihrem konventionellen Vorläufer nicht vorhandenes Allergen gebildet hätte.

1.2.2.4 Qualitätsverbesserung des Sojaöls

Vitamin E ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von acht fettlöslichen Substanzen, von denen α -Tocopherol die höchste biologische Aktivität besitzt. Wichtige Vitamin-E-Lieferanten für den Menschen sind Keimöle und kaltgepresste Speiseöle, ferner Milch, Eier, aber auch einige Gemüsesorten. Viele medizinische Studien weisen darauf hin, dass α -Tocopherol Herz-Kreislaufkrankungen, Entzündungsreaktionen und Krebs vorbeugen oder den Verlauf dieser Krankheiten günstig beeinflussen kann. Allerdings ist die tägliche Aufnahme therapeutisch wirksamer Vitamin-E-Mengen ohne den Verbrauch großer Mengen mit dem Vitamin angereicherter Lebensmittel schwierig. Seit einigen Jahren versucht man deshalb, die pflanzliche Tocopherolsynthese zu optimieren und Pflanzen mit hohem α -Tocopherolgehalt zu züchten. Vor allem Ölpflanzen wie Raps und Soja kommen dafür in Betracht, da diese die bedeutendsten Vitamin-E-Lieferanten sind.

Den Syntheseweg der Tocopherole kennt man seit über 30 Jahren. Da α -Tocopherol das Endprodukt der Tocopherolsynthese bildet und die übrigen Tocopherole Zwischenprodukte der α -Tocopherolsynthese sind, könnte die Überexpression von Enzymen, die Zwischenschritte der Tocopherolsynthese katalysieren, geeignet sein, die biologisch weniger wirksamen β -, γ - und δ -Tocopherole in α -Tocopherol umzuwandeln. Bisherige Versuche, die α -Tocopherolsynthese zu optimieren, beruhen auf diesem Prinzip. Die Überexpression des γ -Tocopherol-Methyltransferasegens von *Perilla frutescens*, einer in Ostasien heimischen Ölpflanze, im Sojasamen liefert Pflanzen, deren Samen gegenüber dem Wildtyp den 10-fachen Gehalt an α -Tocopherol und den 15-fachen an β -Tocopherol haben, was einer ca. 5-fachen Steigerung der Vitamin-E-Aktivität entspricht.

1.2.2.5 Entgiftung des Baumwollsamens

Beim Abernten eines Baumwollfeldes fallen für jedes kg Fasern ca. 1,6 kg Samen an. Nach Tonnage gerechnet ist Baumwolle damit nach der Sojabohne die wichtigste Ölpflanze. Die Samen enthalten ca. 21% Öl und 23% relativ hochwertiges Protein, das aber wegen seines Gehalts an Gossypol und anderen Terpenoiden als Nahrungs- oder Futtermittel nur eingeschränkt verwertbar ist. Gossypol schädigt Herz und Leber. Theoretisch könnten 44 Megatonnen (Mt) Baumwollsaat, die weltweit jährlich geerntet werden und 9 Mt Protein enthalten, den Jahresproteinbedarf (50g/Tag) einer halben Milliarde Menschen decken. Im Baumwollsaamen kann die Gossypolsynthese durch Stilllegung eines der ersten biochemischen Schritte des Gossypolsynthesewegs unterbrochen werden, während sie in den übrigen Pflanzenorganen normal verläuft. In diesen Pflanzen ist der

Gossypolgehalt um bis zu 99% reduziert. Er liegt weit unter dem Grenzwert von 600 ppm (parts per million), den die Weltgesundheitsorganisation (WHO) bei Baumwollsaaten, die zur Verwendung in Lebensmitteln bestimmt sind, für unbedenklich hält.

Neben der Baumwolle kennt man mehrere andere Kulturpflanzen, deren Wert als Nahrungsmittel durch den Gehalt an giftigen Verbindungen stark gemindert wird. Die Samen der Saatplatterbse (*Lathyrus sativus*), einer tropisch/subtropischen Gemüsepflanze, enthalten ein natürliches Nervengift, das β -N-oxalylamino-L-Alanin. Der dauerhafte Genuss ihres Mehls verursacht bei der armen Bevölkerung vieler Länder Asiens und von Teilen Afrikas eine als Lathyrismus bekannte chronische Erkrankung des Nervensystems. Cassava (Maniok) und Favabohnen enthalten cyanogene (Blausäure entwickelnde) Glykoside. Die gentechnische Entgiftung dieser Kulturpflanzen würde nicht nur die Lebensmittelsicherheit verbessern, sondern auch die Versorgung der wachsenden Weltbevölkerung, ohne dass Erträge oder Anbauflächen vergrößert werden müssten.

1.2.3 Synthese neuer Inhaltsstoffe

1.2.3.1 Rekombinierte Proteine und VLP-Impfstoffe

Die Entwicklung, die zur industriellen Produktion rekombinierter Proteine in Pflanzen führte, begann um 1989, als durch Transformation gezeigt wurde, dass Tabak und andere Pflanzen menschliche Proteine wie Interferon, Serumalbumin und Immunglobuline synthetisieren können. Zahlreiche weitere biomedizinisch wichtige Verbindungen wie Insulin, Wachstumshormone und Zytokine sind seitdem in transgenen Pflanzen exprimiert worden (Tab. 4). Seit etwa 1999 sind zwei in biochemischen Laboren viel gebrauchte rekombinierte Proteine auf dem Markt, die in transgenem Mais produziert werden: Avidin, ein Glykoprotein aus Hühnereiweiß und β -Glucuronidase, ein bakterielles Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels. Auch das menschliche Verdauungsenzym Trypsin wird in transgenem Mais produziert und ist kommerziell erhältlich. 2012 erhielt Glucocerebrosidase, ein in Karottenzellkulturen produziertes Enzym, in den USA die Zulassung zur Behandlung des Gaucher-Syndroms, einer schweren autosomal-rezessiv vererbten Störung des Fettstoffwechsels. Verglichen mit mikrobiellen und tierischen Zellkulturen hat die Produktion rekombinierter Proteine in Pflanzen erhebliche Vorteile. Die Produktionskosten sind 10 - 50mal niedriger als in Hefe und bilden nur einen Bruchteil derjenigen in Säugerzellkulturen. Wenn transiente von Pflanzenviren abgeleitete Transformationssysteme eingesetzt werden, braucht man keine transgenen Pflanzen zu entwickeln und in einen jahrelangen Zulassungsprozess zu schicken. Die Expressionsraten transienter Systeme sind oft höher als in transgenen Pflanzen, und das Proteinprodukt steht wesentlich schneller zur Verfügung, was besonders bei der Impfstoffentwicklung (s. u.) wichtig ist.

Antikörper

Antikörper werden für Vorbeugung, Behandlung und Diagnose vieler Krankheiten eingesetzt. In der biomedizinischen Grundlagenforschung braucht man sie für eine Vielzahl analytischer Nachweismethoden. Hergestellt wurden Antikörper pflanzlicher Herkunft bisher vor allem im Tabak, aber auch in Kartoffel, Soja, Luzerne (Alfalfa), Reis und Mais. Allerdings sind darunter nur wenige, die für die Therapie am Menschen infrage kommen. Ein monoklonaler, gegen HBsAg, ein Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus, wirkender Antikörper, war der erste vermarktete Antikörper aus Pflanzen. In Kuba wird er zur Reinigung des rekombinierten Hepatitis-B-Impfstoffs verwendet und hat den zu diesem Zweck gewöhnlich benutzten aus der Maus stammenden Antikörper ersetzt. Ein im Tabak gebildeter Antikörper gegen ein Oberflächenantigen von *Streptococcus mutans*, dem Hauptverursacher der Zahnkaries, hat sich bei lokaler Anwendung als wirksam erwiesen und kann die Rückbesiedelung der Zahnoberfläche durch die Bakterien wirksam verhindern. Er ist 2003 in der EU zur Anwendung am Menschen zugelassen worden und kommerziell erhältlich. Verschiedene andere von Pflanzen gebildete Immunglobuline befinden sich in der klinischen Testphase.

Antigene

Ebenso wie die Herstellung von Enzymen und Antikörpern ist auch die Produktion von Antigenen in Pflanzen im Hinblick auf Kosten, Skalierbarkeit der Produktion und Anwendungssicherheit attraktiv. Den Durchbruch brachte die Entwicklung eines in Tabakzellen produzierten Impfstoffs gegen die atypische Geflügelpest (Newcastle Disease). Die Zellen produzieren ein rekombiniertes Virusprotein, welches bei Hühnern eine starke Immunreaktion erzeugt und sie gegen den Erreger, das Newcastle Disease Virus, schützt. Der Impfstoff ist 2006 von der amerikanischen Zulassungsbehörde (USDA) zur Anwendung zugelassen, aber vom Hersteller nicht vermarktet worden. Seine Herstellung dient als Modell für die Entwicklung weiterer pflanzlicher Impfstoffe für die Tier- und Humanmedizin.

13 Überblick

Erfolge gibt es auch bei der Züchtung transgener Kulturpflanzen, welche Antigene produzieren, mit denen bei oraler Anwendung eine aktive, die Bildung körpereigener Antikörper auslösende Schutzimpfung gegen gefähr-

Produkt	Wirtspflanze	Eigenschaften
Humanproteine		
α -Interferon	Speiserübe (turnip)	erste Pharmaproteine aus Pflanzen
Serumalbumin	Tabak, Kartoffel	
Antikörper		
Immunglobulin (Maus)	Tabak	erster in einer Pflanze gebildeter vollständiger Antikörper
gegen Hepatitis-B		erster industriell genutzter Antikörper aus Pflanzen
gegen <i>Streptococcus mutans</i>		in der EU zur Kariesbehandlung beim Menschen zugelassen
Industrie-/Pharmaproteine		
Avidin	Mais	kommerziell erhältlich
β -Glucuronidase		
Trypsin		
Glucocerebrosidase	Karottenzellkultur	2012 in den USA zur Behandlung des Gaucher-Syndroms zugelassen; erstes therapeutisches Enzym aus Pflanzen
Impfstoffe - Humanmedizin		
Hepatitis B	Tabak, Salat, Lupine, Kartoffel	in der vorklinischen oder klinischen Prüfung, positive Immunantwort bei Mäusen und beim Menschen
<i>Escherichia coli</i> LT-B (ETEC)	Kartoffel, Mais	
Norwalk-Virus	Tabak, Kartoffel	
Impfstoffe - Tiermededizin		
Newcastle Disease Virus HN Protein	Tabakzellkultur	erster marktreifer Impfstoff aus Pflanzen; in den USA zugelassen
Transmissible Gastroenteritis Virus S Protein (TGEV-S-Protein)	Mais	TGEV-Mais ist in Fütterungsversuchen mindestens so wirksam wie konventioneller Impfstoff
Tab. 4. Beispiele rekombinierter Proteine und Impfstoffe aus Pflanzen. Enterotoxische <i>Escherichia-Coli</i> -Stämme (ETEC) können vor allem bei Kleinkindern schwere Durchfallerkrankungen erzeugen. Das Norwalk-Virus ist der Prototyp der humanpathogenen Noroviren, die neben weiteren Viren die verschiedenen Formen der viralen Gastroenteritis (Magen-Darm-Grippe) erzeugen. Das HN-Protein des Newcastle Disease Virus, des Erregers der atypischen Geflügelpest, ist ein immunogenes Enzymprotein, welches infizierte Zellen während des viralen Vermehrungszyklus synthetisieren. Das TGEV-S-Protein ist ein immunogenes Strukturprotein der Virushülle. (Chen & Lai, 2013 ; Liew & Hair-Bejo, 2015).		

liche Infektionskrankheiten möglich ist. TGEV, das übertragbare Gastroenteritis-Virus (Transmissible Gastroenteritis Virus), gehört zur Gruppe der Coronaviren und erzeugt bei jungen Schweinen Durchfallerkrankungen. Bei Jungtieren liegt die Mortalität nahe bei 100%. Der Erreger befällt auch den Menschen. Wenn man Jungschweine mit TGEV-Mais füttert, welcher das S-Protein der Virushülle exprimiert, sind die Tiere gegen das Virus geschützt. Essbare Biotechpflanzen, welche wirksame Impfstoffe bilden, sind bisher zwar nicht auf dem Markt; bei Modellpflanzen wie *Arabidopsis* und Tabak und ebenso bei Nahrungspflanzen wie Mais, Tomate, Soja und anderen gibt es aber bereits zahlreiche Prototypen, welche immunogene rekombinierte Proteine oder von pathogenen Viren abgeleitete nicht infektiöse Viruspartikel bilden und sich in der vorklinischen oder klinischen Prüfung befinden.

VLP-Impfstoffe

VLPs (Virus Like Particles) sind selbstassemblierende aus Virusproteinen aufgebaute Molekülkomplexe. Sie ähneln in Gestalt und Oberflächenstruktur intakten Viren, enthalten aber kein Virusgenom. Sie können sich deshalb nicht vermehren und sind nicht infektiös. Klassische Impfstoffe enthalten abgeschwächte oder abgetötete Pathogene und bilden immer noch den primären Impfschutz vor Infektionskrankheiten. Bei diesen bildet die potentielle Reversion abgeschwächter Viren in den infektiösen Zustand oder die unvollständige Inaktivierung abgetöteter Pathogene ein erhebliches Sicherheitsproblem. Die zur Produktion des Impfstoffs notwendige Inaktivierung kann unerwünschte Epitopveränderungen, d. h. Veränderungen der Oberflächenstruktur des Virus, bewirken, welche seine Wirksamkeit als Impfstoff mindern. Für viele Pathogene gibt es zudem bisher keine sicheren abgeschwächten Stämme oder kein praktikables Gewebekultursystem für ihre Vermehrung und Herstellung. VLP-Impfstoffe haben diese Nachteile nicht. Zudem können sie eine stärkere Immunantwort auslösen als natürliche Viren, wenn virale Proteine, welche Bestandteile natürlicher Viren sind und die Immunantwort unterdrücken können, aus der VLP-Zusammensetzung entfernt werden. Sie sind auch stabiler und wirksamer als andere rekombinierte Antigene und können in gentechnischen Produktionseinrichtungen hergestellt werden, die keine Virusvermehrung erfordern. Durch Genfusion oder chemische Verknüpfung mit Antigenen fremder Pathogene lassen sich chimäre VLP-Impfstoffe herstellen. Ihr Anwendungsspektrum erweitert sich damit auf nicht vom Stammvirus verursachte Infektionskrankheiten. Mehrere VLP-Impfstoffe, darunter 5 gegen Hepatitis B und Papillomviren, sind für die Anwendung am Menschen lizenziert und mit erheblichem klinischem und wirtschaftlichen Erfolg eingesetzt worden. So lag der kumulierte Marktwert, den zwei in Hefe- bzw. Insektenzellkulturen produzierte VLP-Impfstoffe gegen menschliche Papillomviren seit ihrer Einführung bis Ende 2009 erreicht hatten, bei mehr als 4,4 Mrd. USD ([Chen & Lai, 2013](#)). Zugelassene VLP-Impfstoffe sind sehr wirksam und erzeugen eine viele Jahre anhaltende Immunisierung. Weitere VLP-Impfstoffe, u. a. gegen HIV, Influenza und Malaria, sind in der präklinischen und klinischen Entwicklung.

Die kommerzielle VLP-Impfstoffproduktion arbeitet gegenwärtig mit Hefe-, Insekten- und Säugerzellkulturen, die für viele VLPs nicht geeignet sind. Die Produktion von VLPs in Colibakterien ist für viele VLPs getestet worden, hat aber nicht zur kommerziellen Nutzung in Bakterien produzierter VLPs geführt. Das liegt daran, dass Bakterien Prokaryonten sind und als solche die für Tiere und Pflanzen typischen Glykosylierungen und andere postrtranslationelle Proteinmodifikationen nicht durchführen können. Selbst Hefezellen sind dazu nur begrenzt in der Lage. Die nach der Synthese der Polypeptidkette eines Proteinmoleküls an diesem durchgeführten enzymatischen Veränderungen bilden aber wesentliche Eigenschaften von VLP-Impfstoffen. Die beste Umgebung für die Produktion korrekt glykosylierter immunogener VLPs bilden Säugerzellkulturen, deren Unterhaltung aber recht teuer ist. Eine flächendeckende Versorgung ärmerer Länder mit von Säugerzellkulturen produzierten VLP-Impfstoffen ist deshalb unrealistisch.

Die Produktion von VLPs in Pflanzen hat gegenüber derjenigen in Hefezellen oder tierischen Zellkulturen erhebliche potentielle Vorteile. Sie ermöglicht die Bereitstellung großer Impfstoffmengen zu niedrigen Kosten. Das Risiko, bei der Produktion für den Menschen gefährliche Krankheitserreger einzuschleppen ist wesentlich geringer. Die Produktion kann im Bedarfsfall leicht durch Vergrößerung der Anbaufläche hochgefahren werden, ohne dass die Errichtung neuer Produktionsanlagen notwendig wird. Theoretisch läßt sich mit pflanzlichen VLP-Impfstoffen ebenso wie mit rekombinierten in Pflanzen gebildeten Antigenen einfach durch Verzehr der impfstoffhaltigen Pflanzenorgane eine orale Schutzimpfung erreichen. Dies gilt besonders für die Immunisierung gegenüber Noro- und Rotaviren, da diese den Verdauungstrakt befallen. Tierversuche und erste klinische Tests mit Freiwilligen haben diese Erwartungen im Prinzip bestätigen können. Die nadellose orale Schutzimpfung verringert die Infektionsgefahr. Gleichzeitig verbilligen sich Lagerung, Transport und Verteilung des Impfstoffs, da VLP-Impfstoffe bildende pflanzliche Organe wie Samen oder Früchte im Gegensatz zu konventionellen

Impfstoffen nicht laufend gekühlt werden müssen. VLP-haltiges Pflanzenmaterial erzeugt allerdings deutlich schwächere Immunantworten als die orale Verabreichung des gereinigten VLP-Impfstoffs. Beim Verzehr VLP-haltiger Pflanzen bildet auch die richtige Dosierung des Impfstoffs ein bisher nicht gelöstes Problem.

Frühe Versuche, Antigene und Antikörper in Pflanzen wirtschaftlich zu produzieren, scheiterten an der schwachen Expression, der Unmöglichkeit, mehrere Fremdproteine gleichzeitig im richtigen Mengenverhältnis in einer Pflanze zu produzieren und daran, dass Pflanzen zwar wie Tiere Proteine mit vielfältigen Glykosylierungsmustern bilden können, diese aber von denen, die in tierischen Zellen gebildet werden, verschieden sind. Heute können diese Schwierigkeiten im Prinzip als überwunden gelten. Mit transienten Expressionssystemen, die auf Pflanzenviren wie Tabakmosaik- oder Geminiviren beruhen, lassen sich VLPs heute innerhalb von 1-2 Wochen in großen Mengen herstellen. Die Impfstoffproduktion kann dadurch verglichen mit den konventionellen Produktionsplattformen wesentlich beschleunigt werden, was bei human-pathogenen Viren, die wie Influenza-A-Viren schnell evolvieren und dabei ihre Oberflächenantigene verändern, ein entscheidender Vorteil ist. VLPs mit bis zu 3 verschiedenen Proteinbestandteilen lassen sich in Pflanzen heute effektiv assemblieren. Auch das Glykosylierungsproblem ist im Wesentlichen gelöst, da es bereits pflanzliche für die VLP-Produktion nutzbare Zelllinien gibt, welche humane Glykosylierungsmuster erzeugen können. Von den zahlreichen in Pflanzen gebildeten VLP-Impfstoffen haben einige gegen pandemische und saisonale Influenza A, Norwalkvirus, Hepatitis B und Tollwut die klinische Testphase erreicht ([Chen & Lai, 2013](#); [Liew & Hair-Bejo, 2015](#)).

1.2.3.2 Essentielle Fettsäuren

Essentielle Fettsäuren wie Arachidonsäure, Eikosapentaensäure, Dokosapentaensäure und Dokosahexaensäure können vom menschlichen Körper nicht synthetisiert und müssen deshalb mit der Nahrung aufgenommen werden. Die ausreichende Versorgung mit essentiellen Fettsäuren ist eine wichtige Voraussetzung zur Verhinderung permanenter prä- und neonataler Entwicklungsstörungen, da sich nur so die an molekularen Membranen reichen Gewebe des Gehirns, Nerven- und Gefäßsystems normal entwickeln können. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mehr als 19 C-Atomen findet man vor allem in tierischen Fetten. Die Produktion essentieller Fettsäuren in Pflanzen würde der Lebensmittelindustrie eine neue und kostengünstige Quelle dieser ernährungsphysiologisch wichtigen Nahrungsbestandteile erschließen.

Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA) kommen im Rapsöl nicht vor. Die Samen des Braunen Senfs (*Brassica juncea*), einer mit dem Raps eng verwandten asiatischen Ölpflanze, enthalten aber Linolsäure und Linolensäure, welche in drei konsekutiven Schritten in AA und EPA umgewandelt werden können. Man kennt beim Braunen Senf transgene Linien, deren Samenöl im Mittel 4% AA, 8% EPA und 0,2% DHA enthält. Diese Pflanzen tragen 3-9 an der Biosynthese langkettiger Fettsäuren beteiligte Enzymgene, die aus verschiedenen Organismen stammen. Sie sind blockweise in einem einzigen Transformationsschritt übertragen worden. Dies bedeutet eine wesentliche Verringerung des Transformationsaufwands. Wenn auch die Ausbeuten noch gering sind, so zeigen diese Experimente doch, dass es prinzipiell möglich sein muss, den pflanzlichen Lipidstoffwechsel so umzubauen, dass sich essentielle Fettsäuren in Ölpflanzen wirtschaftlich produzieren lassen.

1.3 Energiepflanzen und Biotreibstoffe

1.3.1 Die Menschheit hat ein Energieproblem

Die Auswertung der Förderdaten von 47 ölproduzierenden Staaten mit einem multizyklischen Hubbert-Vorhersagemodell ergab, dass die weltweite Rohölförderung im Jahr 2014 ihr Maximum durchschreiten würde und seitdem mit einer jährlichen Schwundrate von 2,1% irreversibel fällt ([Nashawi u. a., 2010](#)). Sei y die jährliche Fördermenge in Prozent des Maximums, k die Schwundrate und t die seit Erreichen des Maximums verstrichene Zeit. Im einfachsten Fall bleibt k im gesamten Vorhersagezeitraum konstant. Dann gilt für die momentane zeitliche Änderung der Fördermenge y

$$dy/dt = -ky \quad (1)$$

mit $k = 0,021$. Die einfache Differentialgleichung hat die allgemeine Lösung

$$y = e^{(C - kt)} \quad (2)$$

Es ist

$$dy/y = -k dt$$

$$dy/y + k dt = 0$$

$$\int dy/y + \int k dt = C$$

$$\ln y + kt = C$$

$$\ln y = C - kt, \text{ also}$$

$$y = e^{(C - kt)} \quad (3)$$

Verlangt man, dass die Funktion durch den Punkt ($t=0, y=100$), den Punkt des Fördermaximums, gehen soll, ist die Konstante C bestimmt:

$$100 = e^{(C - 0)} = e^C$$

$$C = \ln 100$$

Damit wird

$$y = e^{(\ln 100 - kt)} = e^{\ln 100} \cdot e^{-kt} = 100 \cdot e^{-kt}$$

$$y = 100 \cdot e^{-0,021t} \quad (4)$$

Ersetzt man noch t durch die Kalenderjahre K , wird (4) zu

$$y = 100 \cdot e^{-0,021(K - 2014)} \quad (5)$$

Auf den ersten Blick scheint eine jährliche Minderung der Fördermengen um 2,1% gering zu sein und der Menschheit noch viel Zeit zu lassen, um sich nach anderen Energieträgern umzusehen. Ein Blick auf den Graphen der Funktion (Abb. 5) zeigt jedoch: Die globalen Öl- und höchstwahrscheinlich auch die Gasreserven schwinden mit einer Halbwertszeit von nur 33 Jahren, und am Ende des Jahrhunderts ist fast kein förderbares Öl und Gas mehr da. Nach heutigen Prognosen wird die Menschheit schon im Jahr 2047 von 7,2 Mrd. im Jahr 2014

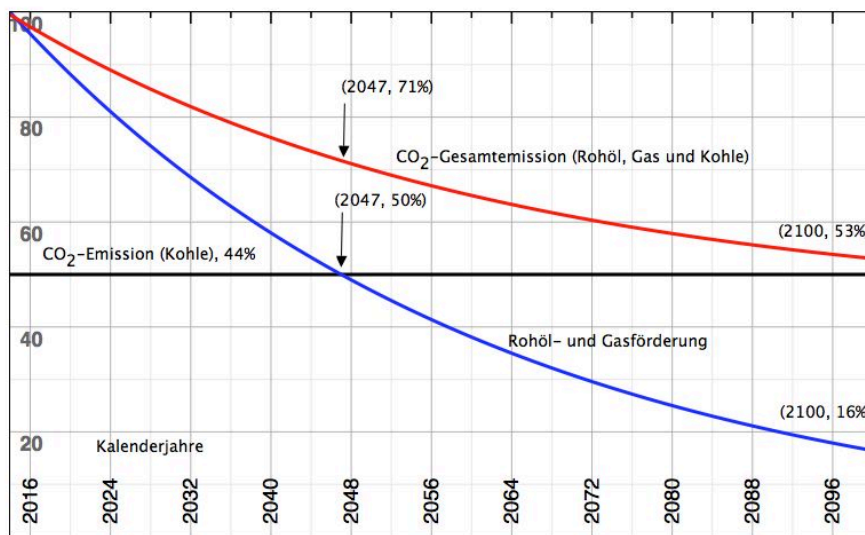


Abb. 5. Simulation der globalen Rohöl- und Naturgasförderung (blau) und der globalen Kohlendioxidemissionen (rot) für den Zeitraum 2014 - 2100. Grundannahmen: 1. Die globale Rohölförderung erreichte 2014 ihr Maximum, und die Reserven sinken seitdem irreversibel um jährlich 2,1% (Nashawi u. a., 2010). 2. Dies gilt im wesentlichen auch für Gas. 3. Der auf Kohle entfallende Anteil der CO₂-Emissionen bleibt in diesem Zeitraum annähernd konstant.

35,3% auf Rohöl und 20,3% auf Naturgas (IEA, 2014). Auf Öl und Gas zusammen entfallen 55,6%, und alle drei Energieträger zusammen verursachen 99,5% der CO₂-Emissionen. Bei konstant bleibender Kohleförderung gilt dann für die Kohlendioxidemission M der 3 fossilen Energieträger in Analogie zu (5)

$$M = 43,9 + 55,6 \cdot e^{-0,021(K - 2014)} \quad (6)$$

Es ist $M(K=2047) = 71,7\%$ und $M(K=2100) = 53,0\%$. Im Jahr 2047, wenn Öl- und Gasreserven auf die Hälfte gesunken sind, werden die globalen CO₂-Emissionen um fast ein Drittel und im Jahr 2100 auf rund die Hälfte des globalen Maximums in 2014 gefallen sein, unabhängig von allen von der Politik verkündeten Einsparzielen.

Auf Öl und Gas entfielen 2012 52,7% des globalen Primärenergieverbrauchs (IEA, 2014). Die Mobilität der Industriegesellschaften beruht fast ausschließlich auf den aus diesen Energieträgern gewonnenen Flüssigtreibstoffen. Da ohne Mobilität weder die landwirtschaftliche noch die industrielle Güterproduktion aufrechtzuerhalten ist, simuliert (5) nicht nur den Schwund der Öl- und Gasreserven sondern, wenn nicht rechtzeitig Ersatz gefunden wird, auch den Niedergang der Überfluggesellschaft, des Wohlstands und der Versorgungssicherheit. Gegen Ende des Jahrhunderts wird es dann nicht mehr möglich sein, die Menschheit ausreichend zu ernähren. Sie wird ihr exponentielles Wachstum einstellen und solange schrumpfen, bis das, was dann noch nutzbare Energiequellen liefern können, zum Überleben reicht.

Der Überlebenskampf der Industriegesellschaft beginnt mit dem Tag, an dem das globale Fördermaximum durchschritten wird. Wie lange es dauert, bis Öl und Gas versiegen, hängt dann nur noch vom Wert der Schwundrate k ab. Die Optimierung alter und die Anwendung neuerer Fördertechniken wie des Frackings lassen hoffen, dass trotz des bei anhaltendem Bevölkerungswachstum und fortschreitender Industrialisierung immer weiter steigenden globalen Energieverbrauchs Korrekturen der Schwundrate nach unten möglich sind. Dies wird sich bald besser beurteilen lassen, weil die Datenbasis immer breiter und der Vorhersagezeitraum immer kürzer wird. An der Endlichkeit fossiler Energieträger und ihrer schließlichen Erschöpfung würde sich zwar nichts ändern, die Menschheit gewänne aber etwas Zeit, um technische und gesellschaftliche Überlebensstrategien zu

auf 9,2 Mrd. angewachsen sein (US Census Bureau, 2014). Der Energiebedarf wird größer, und das Angebot wird kleiner sein als heute. Die Zuverlässigkeit der heute möglichen Prognosen der Gas- und Rohölförderung wird immer noch diskutiert (z. B. Anderson & Conder, 2011; Chapman, 2014). Zwar sprechen neuere Förderdaten und kurzfristige Prognosen dafür, dass das Maximum der globalen Rohölförderung noch vor uns liegt; man ist sich aber in der Fachwelt weitgehend darüber einig, dass die Vorräte gegen Ende dieses Jahrhunderts größtenteils verbraucht sein werden.

Mit den Öl- und Gasreserven verschwinden auch die von diesen Energieträgern verursachten CO₂-Emissionen. Im Jahr 2012 entfielen 43,9% der CO₂-Emissionen auf Kohle,

entwickeln, die einen einigermaßen sanften, nicht durch Verteilungskämpfe und Versorgungskatastrophen herbeigeführten Übergang erleichtern könnten. Soweit heute mögliche Prognosen gültig bleiben, wird schon die nächste Generation den Energiemangel empfindlich spüren. Ihre Nachfahren werden sich in einer Welt behaupten müssen, deren Lebensbedingungen von den heutigen fundamental verschieden sind.

Die deutsche Energiewende soll hier Abhilfe schaffen und verhindern, dass es soweit kommt. Biomasse, Wind- und Solarstrom sollen Öl und Gas ersetzen, und das Potential dieser Energieträger wird als so gewaltig eingeschätzt, dass durch sie nicht nur die drohende Versorgungslücke geschlossen, sondern auch auf Kernkraft und selbst Kohle verzichtet werden kann. Greenpeaceaktivisten haben noch im November 2014 zur Verdeutlichung dieser Vorstellungen 8 t Braunkohle vor die Einfahrt des Bundeswirtschaftsministeriums in Berlin gekippt ([Greenpeace, 2014](#)). Wie realistisch diese Visionen sind, kann man heute gut beurteilen, da man die energetische und volkswirtschaftliche Rentabilität der regenerativen Energiegewinnung im Großen und Ganzen kennt.

1.3.2 Rentabilität energieliefernder Prozesse

Die energetische Rentabilität ER eines energieliefernden Prozesses ist der Quotient aus der vom Prozess gelieferten Bruttoenergie und der Energie, die zu seiner Unterhaltung eingesetzt werden muss, also der Quotient aus Energieaustrag E_a und Energieeintrag E_e :

$$ER = E_a/E_e \quad (1)$$

Im angelsächsischen Schrifttum verwendet man die Bezeichnung EROI oder, seltener, EREOI (energy return on (energy) invested). Die effektive Nettoenergie E_n , welche der Prozess liefern kann, ist die Differenz zwischen Austrag und Eintrag:

$$E_n = E_a - E_e \quad (2)$$

Der Wirkungsgrad W des Prozesses ist der prozentuale Anteil der Nettoenergie an der Bruttoenergie:

$$W = 100(E_a - E_e)/E_a \quad (3)$$

Aus (1) und (3) folgt:

$$W = 100(1 - 1/ER) \quad (4)$$

Es ist $W(1) = 0$

Ein Prozess, der gerade soviel Energie liefert, wie er zu seiner Unterhaltung braucht ($ER=1$), ist nutzlos. Mit stetig wachsendem ER nähert sich der Wirkungsgrad W dem Grenzwert (limes) von 100%:

$$\lim_{ER \rightarrow \infty} W = 100$$

Je weniger Energie ein Prozess verbraucht, desto rentabler ist er und desto besser ist sein Wirkungsgrad. Ein idealer Prozess verbraucht keine Energie und hat einen Wirkungsgrad von 100%. Die Funktion (4) ist nichtlinear. Wie ihr Graph (Abb. 6) zeigt, nimmt der Wirkungsgrad mit abnehmender ER zunächst nur langsam, dann immer schneller ab. Bei einer ER von 2-4 können nur noch 50 - 66% der Bruttoenergie gewonnen werden. Um entscheiden zu können, ob man eine bestimmte Energiequelle zur Energiegewinnung nutzen sollte, muss man die untere Schranke kennen, ab welcher die Nutzung wirtschaftlich sinnvoll ist. Während ältere Studien noch von einer Rentabilitätsgrenze von mindestens 3 ($W \geq 66\%$) ausgingen (Hall u. a., 2009), liegt diese nach neueren Erkenntnissen in hochindustrialisierten Ländern bei mindestens 7 ($W \geq 85\%$, [Weißbach u. a., 2013](#)). Mit Biomasse (ausgenommen Holz) und Photovoltaik ist demnach keine wirtschaftliche Energiegewinnung möglich (Tab. 5).

Die Bewertung einer Energiequelle steht und fällt mit der Zuverlässigkeit, mit welcher ihre Rentabilität ermittelt werden kann. Realistische ER-Werte zu bestimmen ist allerdings selbst bei klassischen Energieträgern wie der Kohle schwierig. Im einfachsten Fall berechnet man nur ER-Werte 1. Ordnung. Dabei berücksichtigt man beim Energieeintrag nur den zum Betrieb der primären Energiequelle erforderlichen Energieaufwand und nimmt als Bruttoenergie den Energiegehalt des Primärprodukts, also den des Rohöls, der Mais- oder Rapsernte oder die elektrische Energie am Windrad. Fortgeschrittenere Berechnungsverfahren liefern ER-Werte 2. Ordnung. Bei diesen erfasst man auch für Lagerung, Transport und Weiterverarbeitung des primären Energieträgers aufzu-

wendende Energiebeträge einschließlich derjenigen zur Unterhaltung der dazu notwendigen Infrastruktur. Wenn bei der Verarbeitung zum Endprodukt stofflich verwertbare Nebenprodukte gebildet werden, bedeutet dies einen Energiegewinn, der, auch wenn sie nicht gebraucht werden, gewöhnlich ebenfalls berücksichtigt wird. Bei der Produktion von Maisethanol ist der größte Teil der Nettoenergie nicht auf den Energiegehalt des Ethanols

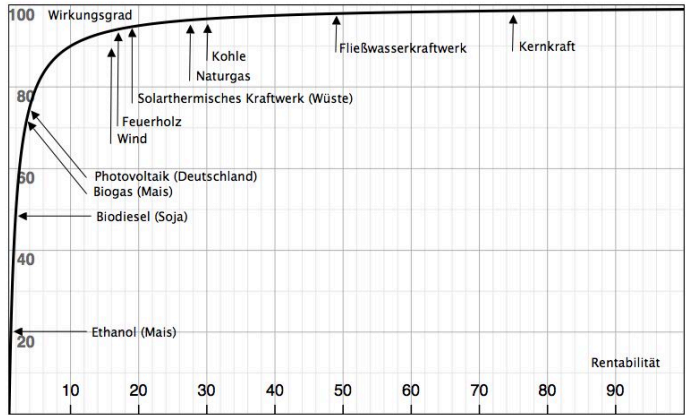


Abb. 6. Energetische Rentabilität ER und Wirkungsgrad W energieliefernder Prozesse.

Energieträger	ER	Wirkungsgrad (%)
Kernkraft	75	98,7
Fließwasserkraftwerk	49	98
Kohle	30	96,6
Naturgas	28	96,4
Solarthermisches Kraftwerk (Wüste)	19	94,7
Feuerholz	17	94,1
Wind	16	93,7
Photovoltaik (Deutschland)	3,9	74,3
Biogas (Mais)	3,5	71,4
Sojadiesel	1,93	48,1
Ethanol (Mais)	1,25	20

Tab. 5. Rentabilität und Prozesswirkungsgrad verschiedener Energieträger. Der bei volatilen Energieträgern anfallende Aufwand für die notwendige Pufferung (s. Abb. 7) ist nicht berücksichtigt. Datenquellen: [Hill u. a., 2006b](#) (Ethanol, Diesel); [Sundberg & Silversides, 1996](#) (Feuerholz); [Weißbach u. a., 2013](#) (übrige).

zurückzuführen, sondern auf das Energieäquivalent der Nebenprodukte, welche als Tierfutter dienen. ER-Werte 3. Ordnung sind die Quotienten aus der gesamten von der Volkswirtschaft direkt und indirekt genutzten Energie, die ein bestimmter Energieträger liefern kann und dem gesamten Energieeintrag, der zur Unterhaltung des Prozesses nötig ist einschließlich aller Folgekosten. Hierzu gehören dann auch Kosten der Vermeidung oder Beseitigung von Umweltbelastungen und anderen Folgeschäden der Energiegewinnung. Die großtechnische Produktion von Maisethanol z. B. entzieht der Landwirtschaft zur Nahrungsmittelproduktion nutzbares Ackerland. Sie verlangt einen hohen Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden und hat einen immensen Trinkwasserverbrauch (285 l/Megajoule). Er ist um 4 Größenordnungen höher als bei Diesel (0,087 l/MJ, [Murphy & Hall, 2010](#)). Die weitere Ausdehnung der Biotreibstoffproduktion muss deshalb die Nahrungsmittelproduktion beeinträchtigen und in wasserarmen Regionen auch die Trinkwasserversorgung.

Publizierte ER-Werte wichtiger Energieträger (Tab. 5) weichen, auch wenn sie für denselben Prozess ermittelt wurden, oft sehr stark voneinander ab. Vielfach ist nicht klar erkennbar, welche Energieflüsse eingerechnet wurden und welche nicht. Überwiegend handelt es sich um ER-Werte 1. Ordnung. Da diese nur einen Teil der Energieeinträge erfassen, sind sie vermutlich zu hoch. Die für Windkraft genannte ER von 16 z. B. berücksichtigt weder den Aufwand der Verkabelung noch den Umfang konventioneller Kraftwerkskapazität, die mangels ausreichender Speichermöglichkeiten vorgehalten werden muss, um die schwankende Verfügbarkeit von Wind auszugleichen. Vor allem bei ER-Werten höherer Ordnung müssen an vielen Stellen Geldkosten in Energieäquivalente umgerechnet werden. Dies gilt z. B. für der chemischen Industrie als Rohstoffe dienende Erdölfraktionen und ebenso für die stofflich verwerteten Nebenprodukte der Biotreibstoffproduktion. Geldkosten und energetische Kosten eines Prozesses sind zwar korreliert. Die finanziellen Produktionskosten eines Prozesses sagen aber über seine energetische Rentabilität nur wenig aus. Dies gilt besonders

bei hochsubventionierten Energieformen, bei denen sich ein Marktpreis infolge vielfältiger staatlicher Eingriffe in das Preisgefüge gar nicht bilden kann. Allerdings gilt die Vermutung, dass energetische Rentabilität und politisch unbeeinflusste Geldkosten bei jeder Form der Energiegewinnung desto enger korrelieren, je mehr indirekte Energieeinträge man berücksichtigt und je vollständiger man ihre Energiebilanz erfasst.

Eine allgemein anwendbare befriedigende Methode zur Ermittlung realistischer ER-Werte gibt es bisher nicht. Systematisch betriebene Grundlagenforschung auf diesem Gebiet existiert weltweit nur ansatzweise und in Deutschland, dem Mutterland der regenerativen Energien, so gut wie nicht, obwohl sie gerade hier besonders nötig wäre. Wenn alternative Energiequellen, besonders solche mit niedriger ER, ohne vorherige gründliche Rentabilitätsanalysen im Produktionsmaßstab erschlossen werden, führt dies leicht zu volkswirtschaftlich und ökologisch schädlichen Fehlinvestitionen und einem Mehrverbrauch an konventioneller Energie. Am Beispiel der US-amerikanischen und europäischen Biotreibstoffproduktion ist dies heute klar erkennbar.

1.3.3 Biodiesel und Bioethanol

1.3.3.1 Primärwirkungsgrad der Photosynthese

Pflanzen verwerten nur einen kleinen Teil der einfallenden Sonnenenergie zur Synthese organischer Verbindungen. Ein großer Teil der Sonnenstrahlung wird von den Blättern und anderen grünen Pflanzenteilen reflektiert oder durchgelassen. Was von den Blattfarbstoffen absorbiert wird, kann nur zu einem Teil in Form von Assimilationsprodukten gespeichert werden. Ein Teil wird für die Atmung des Pflanzenbestandes sofort wieder verbraucht. Ein weiterer geht bei den biochemischen Prozessen der Wasserspaltung und CO₂-Fixierung als Wärme verloren. In Mitteleuropa beträgt die jährliche Sonneneinstrahlung 38 Terajoule/(ha · Jahr), wovon grüne Pflanzen während der Vegetationsperiode 2% und im Jahresmittel 1% für den Massenzuwachs nutzen können ([Strasburger u. a. 1991](#)). Beim Energiepflanzenanbau schmälern schlechte Wetterbedingungen, karge Böden, Krankheiten und Schädlinge den Ernteertrag und können bis zum Totalausfall der Ernte führen. Wenn nicht die ganze Pflanze verwertet wird, sondern nur der Samen, geht ein großer Teil der gebildeten Assimilationsprodukte für die Energieerzeugung verloren. Der Rapsanbau liefert einen mittleren Jahresertrag von 3800 kg Samen/ha, woraus ca. 1700 kg Rapsöl mit einem Energiegehalt von 37 MJ/kg gewonnen werden. Hieraus lässt sich errechnen, dass sich nach dem Abernten eines Rapsfeldes 0,16% der im Erntejahr eingestrahlteten Sonnenenergie im Rapsöl wiederfinden.

Trotz dieser ungünstigen Ausgangslage kann die Treibstoffproduktion aus Biomasse theoretisch sinnvoll sein, falls sie bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllt: 1. Die Produktion muss mit einem deutlichen Nettoenergiegewinn verbunden sein (energetische Rentabilität). 2. Die mit Herstellung und Verwendung von Biotreibstoff verbundene Umweltbelastung und CO₂-Freisetzung darf nicht höher sein als beim konventionellen Treibstoff und sollte im Idealfall deutlich darunter liegen (Umweltverträglichkeit). 3. Der Treibstoff sollte in großen Mengen ohne Beeinträchtigung der Nahrungsmittelerzeugung produzierbar sein (Produktionspotential). 4. Der Treibstoff sollte wirtschaftlich mit Fossiltreibstoffen konkurrieren können (wirtschaftliche Rentabilität). Die Frage nach der wirtschaftlichen Rentabilität ist am leichtesten zu beantworten.

1.3.3.2 Wirtschaftliche Rentabilität

Biotreibstoffe sind verglichen mit Mineraltreibstoffen wirtschaftlich nicht konkurrenzfähig. Die Produktionskosten von Biodiesel waren 2003 rund doppelt so hoch wie die von konventionellem Diesel ([Duncan, 2003](#)). Unter diesen Umständen liegt der wirtschaftliche Nutzen der Biotreibstoffproduktion ausschließlich bei den Herstellern. Es ist zweifelhaft, ob sich die Konkurrenzfähigkeit von Biotreibstoffen infolge steigender Rohölpreise künftig wesentlich verbessern wird. Erstens zeigen die bisherigen Erfahrungen, dass die Preisentwicklung bei Biotreibstoffen den allgemeinen Energiekosten folgt. Zweitens wird bei der Biotreibstoffproduktion Energie verbraucht, weshalb steigende Energiekosten die Produktion von Biotreibstoffen verteuern.

Infolge der niedrigen energetischen Rentabilität der Biotreibstoffproduktion arbeiten die Produktionsbetriebe trotz staatlicher Vergünstigungen nur wenig über der wirtschaftlichen Rentabilitätsschwelle und können deshalb schon durch geringe Verteuerungen des Produktionsprozesses in die roten Zahlen getrieben werden. 2009 sind so zahlreiche amerikanische Maisethanolproduzenten insolvent geworden. Technische Verbesserungen sind sicherlich noch möglich, wobei auch die Biotechnologie einen Beitrag leisten kann. Es erscheint aber zweifelhaft, ob der Schwellenwert (s. u.) erreichbar ist, der als untere Grenze der energetischen Rentabilität einer physikalisch und volkswirtschaftlich sinnvollen Form der Energiegewinnung anzusehen ist.

1.3.3.3 Energetische Rentabilität

Der Anbau von Energiepflanzen verbraucht Energie. Während die in einem Liter Biodiesel (Raps-ödimethylester, RME) gespeicherte und bei der Verbrennung frei werdende chemische Energie bekannt ist - der Energieinhalt von RME entspricht etwa dem von Diesel - ist es schwierig, wenn nicht unmöglich, den Energieverbrauch der Biotreibstoffproduktion exakt und vollständig zu ermitteln. Der gesamte Energieeinstrom setzt sich aus vielen Einzelkomponenten zusammen, deren Beitrag oft nur geschätzt werden kann. Modellhaft kann man sich vorstellen, dass der gesamte Produktionsprozess in einem isolierten agroindustriellen Komplex abläuft, der nur dann Nettoenergie exportieren kann, wenn der Energieinhalt des Biotreibstoffs und aller Nebenprodukte den aller direkten und indirekten Energiezuflüsse übersteigt. Es wird hierbei versucht, den gesamten zur Produktion und Bereitstellung des Treibstoffs notwendigen Energieaufwand zu ermitteln, welcher dem Energiegehalt der produzierten Treibstoffmenge und aller verwertbaren Nebenprodukte gegenübergestellt wird. Der Energieeinsatz beginnt bereits mit der Saatgutproduktion. Hinzu kommt der Energiebedarf für Bodenbearbeitung, Düngung, Schädlings- und Unkrautbekämpfung, für das Abernten der Felder und den Transport des Ernteguts zu den Treibstofffabriken. Zu diesem Teil des Energiebedarfs, der unmittelbar bei der Pflanzenproduktion entsteht, kommt der Energieaufwand für die Unterhaltung und Erneuerung der Produktionsmittel, d. h. des landwirtschaftlichen Maschinenparks, produktionsnotwendiger Gebäude und Einrichtungen, ferner der Energiebedarf der bäuerlichen Haushalte, soweit diese vom Energiepflanzenanbau leben. Für den zur Umwandlung der Ernte in den fertigen Treibstoff notwendigen Energieaufwand gelten ähnliche Überlegungen.

Die Energieproduktion des agroindustriellen Komplexes setzt sich zusammen aus der chemischen Energie des Biotreibstoffs und derjenigen der bei der Produktion anfallenden Nebenprodukte. Wenn diese, wie z. B. das in den Ölpresen zurückbleibende proteinhaltige Raps- oder Sojamehl, nicht direkt verbrannt, sondern als Tierfutter verwendet werden, muss man diesen Komponenten möglichst realistische Energieäquivalente zuweisen. Sind alle Energieflüsse bekannt, dann kann die energetische Rentabilität des Produktionsprozesses als Quotient aus Energieeintrag und Energieaustrag berechnet werden.

Angesichts der Komplexität des Energieeinstroms der Biotreibstoffproduktion und der Vielzahl seiner Komponenten sind mehrere Studien zu dem Schluss gekommen, dass bei Berücksichtigung aller Energieeinträge der energetische Input größer als der Output wird und ein Nettoexport von Energie nicht möglich ist. Zu einem insgesamt positiven Ergebnis kommt eine recht detaillierte Analyse von energetischer Rentabilität, Produktionspotential und Umweltbelastung der in Amerika praktizierten Gewinnung von Bioethanol aus Maisstärke und von Biodiesel aus Sojabohnen ([Hill u. a. 2006a](#)). Sojadiesel liefert hiernach 93% mehr Energie als zu seiner Herstellung aufgewendet wird und Ethanol 25% mehr (Tab. 6). Der Gegensatz zu früheren Untersuchungen wird damit erklärt, dass technische Verbesserungen und Rationalisierungsfortschritte beim Energiepflanzenanbau und der Treibstoffsynthese inzwischen zu einer deutlichen Senkung des Energieverbrauchs geführt haben. Auch andere neuere Analysen kommen zu einem insgesamt positiven Ergebnis. Die ermittelten ER-Werte liegen jedoch fast ausnahmslos unter 2. Das entspricht einem Wirkungsgrad von weniger als 50%.

Verglichen mit Sojadiesel ist der Überschuss beim Maisethanol gering. Er ist zudem größtenteils nicht auf den Energieinhalt des Ethanols zurückzuführen, sondern auf das Energieäquivalent der Nebenprodukte, welche als Tierfutter dienen. Die Ursache der schlechten Rentabilität der Bioethanolproduktion liegt sowohl in dem höheren Energiebedarf der Maisproduktion als auch im energetischen Aufwand, den die Umwandlung von Maisstärke in Ethanol mit sich bringt. Sie verlangt die Hydrolyse von Stärke zu Zucker, dessen Vergärung zu Ethanol und die anschließende Destillation der Gärungsprodukte.

1.3.3.4 Produktionspotential

Keiner der beiden Treibstoffe kann ohne Einschränkung der Nahrungsmittelerzeugung einen signifikanten Teil des amerikanischen Treibstoffverbrauchs decken. In den USA wurden im Jahre 2005 14,3% der Maisernte zu $1,48 \cdot 10^{10}$ l Ethanol verarbeitet. Das ist das Äquivalent zu 1,72% des amerikanischen Benzinverbrauchs. Sojaöl, extrahiert aus 1,5% der Sojaernte, lieferte $2,56 \cdot 10^8$ l Biodiesel, was 0,09% des Dieserverbrauchs entspricht. Bei einer energetisch autarken, nicht von konventionellen Energiequellen gespeisten Biotreibstoffproduktion muss die gesamte Prozessenergie aus Energiepflanzen gewonnen werden. Substituierbar ist der Anteil, der nach Abzug der Prozessenergie noch übrig bleibt. Wäre in den USA 2005 die gesamte Jahresernte von Mais und Sojabohnen zu Biotreibstoff verarbeitet worden, hätte dies ohne Berücksichtigung der verbrauchten Prozessenergie 12% des Benzinverbrauchs und 6% des Dieserverbrauchs gedeckt. Weil aber die Produktion dieser Treibstoffe Energie verbraucht, beträgt der Nettoenergiegewinn nur 2,4% des Benzin- und 2,9% des Dieserverbrauchs. Wie groß der

Abstand zu den konventionellen Energieträgern ist, zeigen auch diese Zahlen: In den USA war der jährliche Zuwachs des fossilen Energieverbrauchs bis zur Finanzkrise 2008 größer als die gesamte Jahresproduktion aus Wind, Photovoltaik und Biomasse zusammen. Der Energieverbrauch der US-amerikanischen Nahrungsmittelproduktion liegt bei 20% des nationalen Energieverbrauchs. 5% davon könnten gespart werden, wenn dort nicht

Produktionsstufe	Maisethanol		Sojadiesel		
	Ethanol	Nebenprodukte	Biodiesel	Sojamehl	Glycerol
Saatgutproduktion	0,002	0	0,004	0,019	0
Treibstoffverbrauch der Agrarproduktion	0,091	0,019	0,031	0,154	0
Dünger und Pestizide	0,102	0,021	0,014	0,071	0,001
Landmaschinenpark und landwirtschaftliche Gebäude	0,008	0,002	0,007	0,035	0,001
Energieverbrauch der bäuerlichen Haushalte	0,046	0,009	0,034	0,169	0,004
Energieverbrauch der Treibstofffabriken	0,498	0,101	0,141	0,089	0,015
Bau und Instandhaltung der Treibstofffabriken	0,002	0,000	0,001	0,001	0,000
Energieverbrauch der Haushalte der Fabrikarbeiter	0,006	0,001	0,026	0,003	0,003
Transport von Ernte und Treibstoff	0,042	0,008	0,015	0,018	0,002
Gesamtverbrauch	0,797	0,162	0,273	0,560	0,029
Zusammenfassung					
Produkt	Maisethanol		Sojadiesel		
	Input	Output	Input	Output	
Treibstoff	0,797	1	0,273	1	
Nebenprodukte	0,162	0,203	0,589	0,666	
Total	0,959	1,203	0,861	1,666	

Tab. 6. Energiezuflüsse der Biotreibstoffproduktion in MJ pro MJ der gewonnenen Treibstoffenergie ([Hill u. a., 2006b](#)).

20% der Nahrungsmittel weggeworfen würden. Das ist 10-mal mehr als alle amerikanischen Windmühlen und PV-Anlagen produzieren ([Murphy & Hall, 2010](#)).

In Deutschland ist dies nicht anders. Die energetisch autarke Produktion von Biotreibstoffen auf der gesamten deutschen Ackerfläche (16,7 Mha) lieferte maximal entweder 5,7% (RME) oder 3,5% (Ethanol) des gesamten jährlichen Diesel- oder Benzinverbrauchs (Tab. 7). Allenfalls ein Viertel der Fläche kann ohne Beeinträchtigung der Nahrungsmittelproduktion zum Energiepflanzenanbau genutzt werden. Beim Raps ist dies bereits berücksichtigt, da dieser nur alle 4 Jahre im Fruchtwechsel mit anderen Pflanzen auf derselben Fläche angebaut werden sollte. Beim Bioethanol verringert sich das effektive Produktionspotential auf 1/4 und liegt dann noch bei 0,9% des Treibstoffverbrauchs. Selbst diese Werte sind noch zu hoch, wenn man bedenkt, dass die angenommenen Prozesswirkungsgrade auf ER-Werte 2. Ordnung zurückgehen, bei denen Umweltbelastungen und andere indirekte Kosten der Energiegewinnung nicht berücksichtigt werden. Sicherlich kann der Prozesswirkungsgrad durch Anbau besser geeigneter Sorten, Verbesserung der Extraktionstechnik, Verringerung der bei der chemotechnischen Umwandlung des Pflanzenöls in den fertigen Treibstoff entstehenden Verluste und andere Maßnahmen noch verbessert werden. Eine ins Gewicht fallende Absenkung des Mineralölverbrauchs ergibt sich

23 Überblick

dadurch nicht: Die bei einem Prozesswirkungsgrad von 100% auf einem Viertel der einheimischen Ackerfläche theoretisch mögliche jährliche RME-Produktion entspricht 11,4 % des Dieserverbrauchs.

In Deutschland galt von 2007 - 2008 eine Beimischungspflicht von 4,4% (v/v) und 2009 von 5,25% Biodiesel zu herkömmlichem Diesel. Für die Jahre 2010 bis 2014 wurde eine Beimischung von 6.25 % festgeschrieben. Im Inland mangels ausreichender Ackerfläche nicht produzierbare Differenzmengen werden importiert. Ab 2020 will man die Beimischung von Biotreibstoffen so berechnen, dass die Treibhausgase um 7% gesenkt werden. Solide, auf zuverlässigen Rentabilitätsanalysen fußende Berechnungsverfahren gibt es dazu bisher nicht.

	RME	Bioethanol	Diesel	Benzin	Heizöl	Holz
Hektarertrag	1200 l/ha	400 l/ha	-	-	-	8 m³/ha
mittlerer Hektarertrag	300 l/ha	400 l/ha				8 m³/ha
Dichte (kg/l)	0,879	0,79	0,83	0,75	0,83	0,5
mittlerer Hektarertrag (kg/ha)	264	316				4000
Bruttoproduktion/ Verbrauch (Mt/Jahr)	4,4	5,27	32,1 (2010)	19,7 (2010)	21,4 (2010)	67
Heizwert (PJ/Mt)	37	26,8	42,5	41	42,5	14,4
Bruttoproduktion/Verbrauch (PJ/Jahr)	163	141	1364	807	909,5	965
Prozesswirkungsgrad	48%	20%	-	-	-	94%
Nettoproduktion/Verbrauch (PJ/Jahr)	78,2	28,2	1364	807	909,5	907
substituierbar	-	-	5,7%	3,5%	99,7%	-

Tab. 7. Produktionspotential von RME (Rapsödimethylester), Maisethanol und Feuerholz in Deutschland. Die energetisch autarke, nicht mit dem Einsatz von fossilen Treibstoffen unterhaltene Produktion von Biotreibstoffen auf der gesamten deutschen Ackerfläche von 16,7 Mha lieferte maximal entweder 5,7% (RME) oder 3,5% (Ethanol) des gesamten jährlichen Diesel- oder Benzinverbrauchs. Dagegen könnten Aufforstung und Verfeuerung des Holzertrags 100% des jährlichen Heizölverbrauchs ersetzen. 1 PJ (Petajoule) = 10^{15} Joule. Raps ist nicht selbstverträglich und kann auf derselben Fläche nur alle 4 Jahre im Fruchtwechsel mit anderen Pflanzen angebaut werden. Der angegebene Holzertrag ist der mittlere jährliche Derbholzertrag über alle Baumarten. Mangels zuverlässiger Daten ist angenommen, dass die energetische Rentabilität der deutschen RME-Produktion derjenigen der Sojadieselproduktion (Tab. 5) entspricht. Die dem Prozesswirkungsgrad zugrundegelegten ER-Werte sind 2. Ordnung.
 Datenquellen: Wikipedia (Stoffkonstanten), [Zechner u. a., 2011](#) (Hektarertrag Maisethanol), [Geringer & Tober, 2012](#) (Hektarertrag RME), [Kaltschmitt 2009](#) (Holzertrag), [AGEB 2011](#) (Mineralölverbrauch), [FAOSTAT 2016](#) (Ackerfläche Deutschlands).

1.3.3.5 Umweltverträglichkeit

Die Energiegewinnung aus Biomasse belastet die Umwelt. Umweltbelastungen entstehen einerseits durch den Eintrag von Düngemitteln, die vor allem Stickstoff und Phosphor enthalten, und von Pestiziden in den Boden und von dort in Grundwasser, Flüsse und Seen, andererseits durch Emission gasförmiger und fester Luftschadstoffe, die nicht nur bei der Verbrennung des Biotreibstoffs entstehen, sondern bereits bei dessen Produktion. Zur Ermittlung der Umweltbilanz eines Biotreibstoffs kann man im Prinzip so vorgehen wie bei der Berechnung der energetischen Rentabilität. Man muss hierzu für jeden Schadstoff und jeden Treibstoff die gesamten auf die Energieeinheit bezogenen Nettoemissionen ermitteln, die bei der Produktion und Verbrennung gebildet werden und diese dann vergleichen. Eine vergleichende Umweltbilanzierung von Bio- und Mineraltreibstoffen stößt insofern an methodische Grenzen, als die Produktionslinien völlig verschieden sind und weder bei der Produktion noch bei der Verbrennung exakt die gleichen Schadstoffe gebildet werden.

Nach [Hill u. a. \(2006a\)](#) reduziert Sojadiesel die Emission von Treibhausgasen gegenüber Petrodiesel um 41%. Die Bioethanolproduktion bewirkt eine Reduktion um 12%. Die Umweltbelastung durch Luftschadstoffe, Nitrit, Nitrat und Pestizide ist bei der Bioethanolproduktion wesentlich größer als bei der von Sojadiesel. Die Umweltvorteile der Sojadieselproduktion liegen ebenso wie die bessere energetische Rentabilität daran, dass die Sojaproduktion agrartechnisch weniger aufwendig ist als die von Mais und Sojaöl mit weniger Aufwand in Treibstoff umgewandelt werden kann als Maisstärke. Alle diese Berechnungen gelten unter der Voraussetzung, dass die Agrarproduktion auf bereits kultiviertem Ackerland betrieben wird. Werden intakte natürliche Ökosysteme urbar gemacht und zur Treibstoffproduktion verwendet, kann die Reduktion der Treibhausgase weitaus geringer ausfallen oder sich ins Gegenteil verkehren, d. h. die Emissionen können größer werden als beim Mineraltreibstoff. Da Biotreibstoffe Mineralöl bei weitem nicht ersetzen können, kann man sich komplexe vergleichende Emissionsberechnungen im Grunde sparen.

1.3.3.6 Wege zur Verbesserung der Rentabilität

Produktionspotential und Umweltfreundlichkeit der Energieerzeugung aus Biomasse sind positiv mit der energetischen Rentabilität der Produktionsverfahren korreliert. Wenn Energie aus Biomasse gewonnen werden

Ökosystem	Fläche 10 ⁶ km ²	Nettoprimärproduktivität g/(m ² ·a)		Nettoprimärproduktion (weltweit) 10 ⁹ t/a
		Normbereich	Mittelwert	
(Sub)tropische Regenwälder	17,0	1000 - 3500	2200	37,4
Regengrüne Monsunwälder	7,5	100 - 2500	1600	12,0
Temperate Regenwälder	5,0	600 - 2500	1300	6,5
Sommergrüne Laubwälder	7,0	600 - 2500	1200	8,4
Boreale Nadelwälder	12,0	400 - 2000	800	9,6
Kulturland	14,0	100 - 3500	650	9,1
Temperate Steppen	9,0	200 - 1500	600	5,4
Tundren	8,0	10 - 400	140	1,1

Tab 8. Nettoprimärproduktivität und Nettoprimärproduktion einiger natürlicher Ökosysteme und von Kulturland ([Strasburger u. a. 1991](#)).

soll, muss es deshalb vor allem darum gehen, die Energiebilanzen zu verbessern. Tatsächlich gibt es für die Energieerzeugung aus Biomasse effizientere Wege als die Synthese von Treibstoff aus pflanzlichen Nahrungsmitteln. Der einfachste Weg zur Steigerung der energetischen Rentabilität des Energiepflanzenanbaus ist die Direktverfeuerung der Mais- und Rapsernten zum Heizen und zur Stromerzeugung. Hierbei kann auch der

Energieanteil genutzt werden, der bei der Treibstoffproduktion verlorengeht. Bei Biodiesel sind dies 52% und beim Maisethanol 80% der im Samen gespeicherten Primärenergie. Eine weitere, wesentlich größere Einsparung von Fossiltreibstoffen ergibt sich, wenn die für den Anbau von Energiepflanzen genutzten Flächen aufgeforstet werden. Da ein großer Teil der photosynthetischen Assimilationsprodukte - beim Mais die Hälfte, bei Holzpflanzen fast 100% - in den vegetativen Pflanzenorganen gespeichert wird, sind Bäume eine wesentlich ergiebigere Quelle energetisch nutzbarer Biomasse als Ackerpflanzen. Die Primärproduktion sommergrüner Laubwälder liegt bei 8,4 t pro Hektar und Jahr, diejenige borealer Nadelwälder bei 9,6 t pro Hektar und Jahr (Tab. 8). Der mittlere Derbholzertrag in deutschen Forsten beträgt 4 t pro Hektar und Jahr (Tab. 7). Der damit auf der gesamten deutschen Ackerfläche mögliche Brennholzertrag entspricht 907 PJ/Jahr (Tab. 7). Er könnte den Verbrauch an leichtem Heizöl zu 100% ersetzen und entspricht dem 11-fachen ($907/78,2$) der maximal möglichen RME-Produktion. Das 11-fache an Mineralöl könnte also eingespart werden, wenn die für den Anbau von Energieraps und -mais missbrauchten Flächen aufgeforstet und der Holzertrag verfeuert würde. Im Gegensatz zum Ackerbau brauchen Wälder keine Bodenbearbeitung, keine regelmäßige Pestizidanwendung, keine Bewässerung und keinen Dünger. Die indirekten Kosten der Energiegewinnung sind deshalb in der Forstwirtschaft geringer als beim Ackerbau. Könnte man die Vergleichsrechnung auf zuverlässige ER-Werte 3. Ordnung stützen, würde sich vermutlich zeigen, dass das Missverhältnis noch weit größer ist.

1.3.3.7 Zusammenfassung

Das Studium der Energie- und Umweltbilanzen der Produktion von Bioethanol und Biodiesel zeigt:

- Der Energiebedarf der Pflanzenproduktion und der nachgelagerten Umwandlung der Ernte in den fertigen Treibstoff ist relativ hoch und darf bei Rentabilitätsberechnungen und Bilanzvergleichen keinesfalls vernachlässigt werden.
- Die Umwandlung von Biomasse in Treibstoff ist weder schadstofffrei noch ist sie CO₂-neutral. Es ist zwar richtig, dass die Verbrennung von Pflanzen nicht mehr CO₂ freisetzen kann als die Pflanzen zuvor aus der Luft aufgenommen haben. Als Argument für die Umweltfreundlichkeit der Energieerzeugung aus Biomasse taugt die Behauptung indessen kaum. Die mit der Agrarproduktion und ihrer chemotechnischen Umwandlung in Treibstoff notwendigerweise verbundenen Emissionen sind signifikant und dürfen bei der Bilanzierung ebensowenig vernachlässigt werden wie der Energieverbrauch.
- Energetische Rentabilität und Umweltverträglichkeit der Biotreibstoffproduktion hängen stark von der Pflanzenart, der Art des Treibstoffs und den agrotechnischen Produktionsbedingungen ab. Will man zuverlässige Ergebnisse erhalten, dann muss man die Bilanzierung für jede Kombination dieser Parameter von neuem durchführen.
- Die energetische Rentabilität der Treibstoffproduktion aus Nahrungspflanzen liegt nach heutigem Wissen unter der notwendigen Rentabilitätsschwelle. Sie ist geringer als die der Direktverfeuerung der Ernte und um ein Vielfaches geringer als die der Holzverbrennung. Gemessen am Treibstoffbedarf industrialisierter Volkswirtschaften ist das Produktionspotential so niedrig, dass weder beim Mineralölverbrauch noch bei den Emissionen ins Gewicht fallende Einsparungen möglich sind. Deshalb können die immensen Subventionen, mit denen sie in den USA und in Europa angetrieben wird, die bevorstehende Erschöpfung der Öl- und Gasvorräte nicht verlangsamen.

1.3.4 Kann Wind- und Sonnenstrom die Lücke füllen?

*Jung gelehrt und alt gewohnt
seh'n die Deutschen in den Mond.
N. N.*

Wenn Biomasse Öl und Gas nicht ersetzen kann, wie steht es dann mit der Stromerzeugung aus Sonnenlicht und Wind? Im Rahmen einer Abhandlung über Gentechnik und Landwirtschaft kann es nicht in erster Linie darum gehen, physikalische, chemische und geologische Grundvoraussetzungen der deutschen Energiewende zu hinterfragen. Dies ist auch nicht notwendig; denn bereits ein kurzer Blick in diese Richtung und in die existierende Fachliteratur zeigt, welche Antwort die Natur auf diese Frage gibt:

1. Die Energiedichte von Wind und Sonnenstrahlung ist gering. Ein großes Kohle- oder Kernkraftwerk liefert kontinuierlich soviel Energie wie mehrere tausend moderne an Land aufgestellte Windturbinen. Beispiel: Die beiden Blöcke des AKW Grundremmingen, des größten deutschen Kernkraftwerks, leisten zusammen 2688

Megawatt und decken damit 25% des bayrischen Strombedarfs ([Grundremmingen, 2014](#)). Moderne Landwindturbinen haben eine mittlere Nennleistung von 2,8 MW und eine mittlere Auslastung von ca. 23% ([Freude & Snurr, 2011](#)). Grundremmingen liefert also soviel Strom wie 4174 an Land stehende Windräder. Die Auslastung der in Baden-Württemberg stehenden Windräder ist geringer. Bei einer Nennleistung von insgesamt 505 MW lieferten diese 2012 666'000 MWh und deckten damit 1,1% der baden-württembergischen Bruttostromproduktion ([AEE, 2014](#)). Daraus errechnet sich eine mittlere Auslastung von 15%. Um Grundremmingen der Strommenge nach zu ersetzen, würde man in Baden-Württemberg 6442 2,8-MW-Windräder brauchen. In dichtbesiedelten Gebieten bildet allein die Standortfrage ein nicht lösbares Problem. Man mag einwenden, dass die Auslastung bei küstenfernen Meerwindparks mit ca. 43% ([Freude & Snurr, 2011](#)) wesentlich besser ist und auf den Festlandssockeln der Meere mehr als genug Platz für Windräder zur Verfügung steht. Dies bedeutet aber einen weit größeren Aufwand für Errichtung und Instandhaltung der Anlagen, die Anbindung der Windparks an das Festlandsnetz und den dort notwendigen Trassenbau. All dies senkt die energetische Rentabilität der Windstromproduktion und damit ihr Produktionspotential. Dies ist dann besonders problematisch, wenn ein wachsender Teil der Stromerzeugung von der Elektromobilität beansprucht wird.

2. Zivilisierte Gesellschaften benötigen in allen Lebensbereichen eine konstante Energieversorgung. Wind und Solarstrom sind volatile Energieformen, die mangels ausreichender Speichermöglichkeiten gepuffert werden müssen. Dazu muss, wenn in Spitzenzeiten keine Energie verschwendet werden soll, die gesamte Nennleistung gepuffert werden. Bei Wind- und Solarstrom wird die energetische Rentabilität durch die Notwendigkeit der Pufferung drastisch reduziert. Oft werden dazu gut regelbare Gaskraftwerke vorgeschlagen. Kraftwerke, die nur zeitweise liefern dürfen, sind jedoch unwirtschaftlich. Ihr Bau und ihre Unterhaltung senken nicht nur die finanzielle, sondern auch die energetische Rentabilität der Wind- und Solarstromproduktion. Und: welchen Nutzen können Gaskraftwerke noch haben, wenn es dann, wenn sie wirklich gebraucht würden, fast kein Gas mehr gibt?

3. Das Speicherproblem ist nicht gelöst. Zur Speicherung großer Energiemengen mit gutem Wirkungsgrad eignen sich nur Speicherseen ([Lang, 2009](#); [Weißbach u. a. 2013](#); [Blaser & Pritzker, 2014](#)). Die Speicherung von Wind- und Solarstrom durch elektrolytische Produktion von Wasserstoff liegt weit unter der energetischen Rentabilitätsgrenze. Es ist kein weiterer physikalischer Effekt bekannt, den man zur verlustarmen Speicherung großer Energiemengen nutzen könnte. Würde man ihn heute entdecken, so würde es Jahrzehnte bis zu einer großtechnischen Nutzung dauern. Sie käme mit Sicherheit zu spät.

Pumpspeicherwerke lassen sich in Deutschland geologisch - nicht auch siedlungspolitisch - nur in den Mittelgebirgen realisieren, und, um die gesamte volatile Energie bestehender und geplanter Wind- und Solarparks puffern zu können, bräuchte man Pumpspeicherwerke von fast kosmischen Dimensionen. In einer auf die Verhältnisse Australiens zugeschnittenen Analyse des Versorgungspotentials der Photovoltaik findet man hierzu unter anderem folgende Kennzahlen: Um Wirtschaft und Privathaushalte Australiens zu jeder Jahreszeit nur 30 Tage lang allein mit gepuffertem Solarstrom versorgen zu können, bräuchte man ein Pumpspeicherwerk mit einer Gesamtfläche von 7927 km² und eine Solarfläche von 2872 km², insgesamt also 10'798 km². Die Kapitalkosten der Anlage betrügen das 2,8-fache des australischen Bruttoinlandsprodukts. Verglichen mit Kernkraft ist Photovoltaik 25mal teurer, erzeugt das 20fache an CO₂-Emissionen und hat mindestens den 400fachen Flächenverbrauch ([Lang, 2009](#)). Der deutsche Stromverbrauch war 2012 mit 526'000 GWh 2,7mal so hoch wie der australische (194'000 GWh). Die Seefläche betrüge dann unter sonst gleichen Bedingungen 21'700 km². Das ist die 40-fache Fläche des Bodensees (536 km²). Werden PV-Anlagen in sonnenarmen Gegenden betrieben, verschlechtert sich die energetische Rentabilität so sehr, daß keine Nettoenergie mehr gewonnen werden kann. In Deutschland und der Schweiz betriebene PV-Anlagen haben einen erweiterten EROI (EROI 3. Ordnung, s. o.) von 0,82. Sie sind damit ausnahmslos keine Energieerzeuger, sondern Energievernichter. Für jede investierte Kilowattstunde bekommt man nur 0,82 kWh zurück ([Ferroni & Hopkirk, 2016](#)).

4. Wenn die Notwendigkeit der Speicherung/Pufferung und der dadurch entstehende Zusatzaufwand angemessen berücksichtigt werden, liegt der Wirkungsgrad aller regenerativen Energiegewinnungsformen mit der einzigen Ausnahme in Wüstengebieten aufgestellter solarthermischer Kraftwerke unter der Rentabilitätsgrenze. Auch letztere dürften die Rentabilitätsschwelle nicht mehr erreichen, wenn der Aufwand des Anschlusses an die europäischen Netze bekannt wäre und berücksichtigt würde (Abb. 7).

Die politisch verordnete Energiewende bedient die Vorstellung, das Energie- und Mobilitätsproblem der Menschheit sei mit der Hinwendung zur regenerativen Energiegewinnung grundsätzlich gelöst, und deshalb

könne man sich Fortsetzung oder gar Priorisierung energetisch relevanter Grundlagenforschung ebenso sparen wie die Weiterentwicklung der existierenden nicht regenerativen Produktionsprozesse. Man müsse nur genügend viele Windräder und Solarpaneele aufstellen, Stromtrassen errichten, Energiepflanzen anbauen und Elektroautos fahren lassen, damit Energieversorgung und Mobilität nachhaltig gesichert sind.

Mit Fragen der Energiegewinnung und ihren inhärenten Rentabilitätsproblemen vertraute Wissenschaftler und

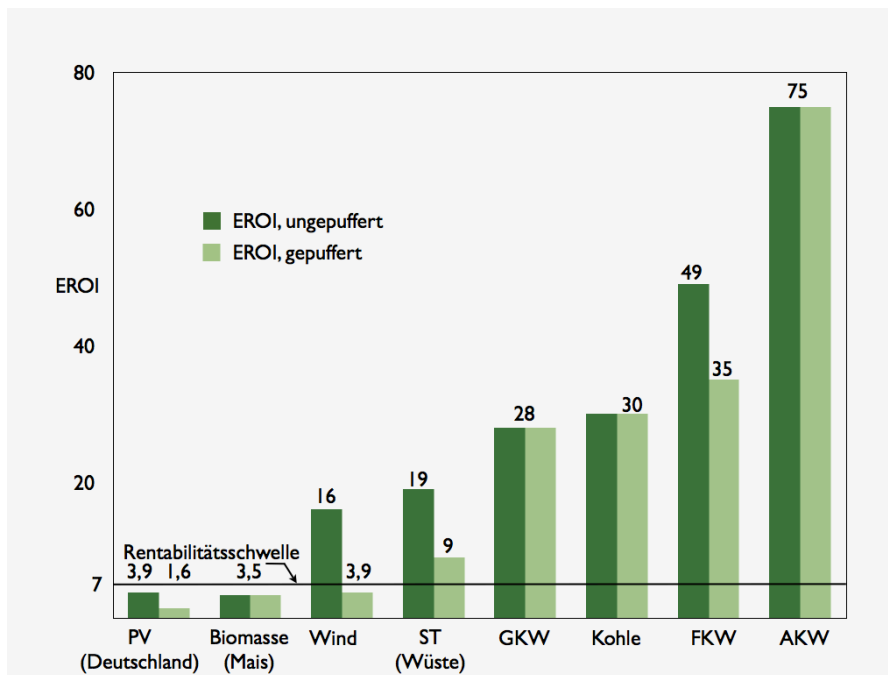


Abb. 7. Energetische Rentabilität EROI regenerativer und nichtregenerativer Energieproduktionsprozesse mit und ohne Pufferung. PV Photovoltaik, ST solarthermisches Wüstenkraftwerk (ohne Berücksichtigung der Anbindung an europäische Netze), GKW Gaskraftwerk, FKW Fließwasserkraftwerk, AKW Atomkraftwerk (Druckwasserreaktor); (Weißbach u. a., 2013. Energy 52:210-221)

Ingenieure sehen dies anders. Sie halten den Versuch, neben der (noch) existierenden eine zweite komplett neue Energieversorgung aufzubauen, für einen zum Scheitern verurteilten politisch-ideologisch motivierten Sonderweg, dessen Sinnlosigkeit sich schon daraus ergibt, dass die deutschen CO₂-Emissionen, die zur Begründung herhalten müssen, nur 2,6% der globalen ausmachen (Statista, 2014; IEA, 2014) und letztere mit der Erschöpfung von Öl, Gas und schließlich auch Kohle in kulturgeschichtlich, erst recht in erdgeschichtlich kurzer Zeit von selbst verschwinden. Sie glauben, dass in vorhersehbarer Zukunft nicht auf Kernkraft und erst recht nicht auf Kohle verzichtet werden kann und alle physikalisch-technisch sinnvollen Möglichkeiten der Energiegewinnung genutzt werden müssen, um künftig wenigstens die elementarste Grundversorgung der Menschheit einigermaßen zu befriedigen.

Auch die Agrogentechnik kann dazu einen Beitrag leisten. Sie senkt den Energieverbrauch, schont den Boden, verringert die Pestizidbelastung und verbessert die Erträge. Transgene Industrie-pflanzen wie die Amflora-Kartoffel können den zur Reinigung aus Pflanzen gewonnener Industrierohstoffe notwendigen Wasser- und Energieverbrauch senken. Die Entwicklung von Biotechpflanzen, welche ernährungs-physiologisch vollwertige Proteine und alle Vitamine bilden können und gleichzeitig frei von Allergenen und anderen der Ernährungsqualität abträglichen Begleitstoffen sind, kann die Fleischerzeugung reduzieren, ohne dass die Proteinversorgung beeinträchtigt wird, und dies wird ebenfalls den Energieverbrauch der Nahrungsmittelproduktion senken. Schließlich können durch Viren und andere Krankheitserreger verursachte Produktionsausfälle in der Tier- und Pflanzenproduktion wahrscheinlich schon in überschaubarer Zukunft wirksam verringert werden, indem Nahrungspflanzen entwickelt werden, deren Wirkstoffe körpereigene Schutzmechanismen aktivieren können. Vielleicht wird es eines Tages sogar gelingen, den Wirkungsgrad der Photosynthese zu verbessern und die Energiegewinnung aus Biomasse wirtschaftlicher zu machen. Die positiven Auswirkungen des Biotechpflanzenanbaus sind seit Jahren bekannt und durch eine Vielzahl einschlägiger Untersuchungen belegt. In einer umfangreichen Metastudie sind sie kürzlich erneut bestätigt worden (Klümper & Qaim, 2014).

1.4 Zulassungspraxis und Biosicherheit

Verachte nur Vernunft und Wissenschaft.....

Mephisto

Die Gentechnik ist im Gegensatz zur Nukleartechnik keine Risikotechnologie. Die Wirkungen der bei einer Neuzüchtung eingeführten genetischen Modifizierungen hängen nicht von der Methode ab, mit der die Modifizierungen hervorgerufen wurden, wie Transformation, konventionelle Kreuzung oder Mutagenese, sondern nur von den Eigenschaften der in ihrer DNA-Sequenz veränderten Gene und ihrer Genprodukte. Die qualitativen Eigenschaften mit gut untersuchten Genen transformierter Biotechpflanzen sind deshalb vorhersehbar. Unerwartete Wechselwirkungen mit Genen der Empfängerpflanzen werden kaum beobachtet, und vermarktete Biotechpflanzen unterscheiden sich bis auf die neuen Merkmale so gut wie nicht von ihren konventionellen Vorläufern. Von der konventionellen Pflanzenzüchtung lässt sich dies nicht behaupten. Hier werden nicht einzelne Gene mit genau bekannten Funktionen übertragen. Es werden komplette Genome verschmolzen, die sich an vielen Stellen der Genomsequenz unterscheiden können. Jedes Pflanzengenom enthält zehntausende von Genen, darunter viele, deren Funktionen man nicht kennt. Da viele agronomische Merkmale polygener Natur sind, das heißt, von zahlreichen Genen beeinflusst werden, führt die Einkreuzung eines neuen positiven Merkmals in eine Kultursorte nicht selten zu einer nicht vorhersehbaren Minderung anderer Leistungsmerkmale. Es gelingt keineswegs immer, durch Weiterzüchtung der neuen Sorte die ungünstigen Genkombinationen zu entfernen, ohne dass auch die positiven Merkmale wieder verlorengehen. Bei der Mutationszüchtung, einem anderen seit langem praktizierten klassischen Verfahren, behandelt man Saatgut oder andere Pflanzenteile mit ionisierenden Strahlen oder mutagenen Chemikalien. Anschließend versucht man, in der Nachkommenschaft der behandelten Pflanzen Individuen mit neuen positiven Eigenschaften auszumachen. Bei Mais, Soja und anderen Kulturpflanzen ließen sich so Resistenzen gegen verschiedene Herbizide isolieren. Mutationen sind Zufallsereignisse. Soweit sie Auswirkungen auf den Phänotyp haben, sind diese in der Regel schädlich und nicht selten sogar tödlich für das Individuum. Bei keinem dieser konventionellen Züchtungsverfahren sind jemals Sicherheitsbestimmungen erlassen worden, die sich nach Umfang und Stringenz auch nur entfernt mit denen vergleichen ließen, die für die Zulassung von Biotechpflanzen zu erfüllen sind. Mit gentechnischen Arbeitsmethoden vertraute Genetiker und Molekularbiologen vertreten seit langem einhellig die Meinung, dass die Gentechnik kein höheres Gefahrenpotential birgt als die traditionelle Pflanzenzüchtung.

Schon ein kurzer Streifzug durch das Internet zeigt, dass viele Anbieter und Nutzer, vor allem im deutschsprachigen Raum, der Anwendung der Gentechnik in der Landwirtschaft ablehnend bis feindlich gegenüberstehen. Es überwiegt die Meinung, dass transgene Pflanzen und daraus hergestellte Lebensmittel umweltgefährdend und gesundheitsschädlich sind und der Biotechpflanzenanbau ausschließlich dem Gewinnstreben großer internationaler Konzerne dient. Die Existenz des besonderen Gefahrenpotentials, welches der Agrogentechnik von ihren Verhinderern zugeschrieben wird, ist theoretisch nicht begründbar. Es ist z. B. nicht einzusehen, warum ein ungefährliches seit Jahrzehnten im Pflanzenschutz versprühtes natürliches hochselektives Insektengift wie das Bt-Toxin gefährlich werden sollte, wenn es die Pflanzen selbst produzieren, dazu noch in weit geringeren Mengen als sie bei Sprühungen zum Einsatz kommen. Bisher ist keine der von den Gentechnikgegnern verbreiteten Unheilprophezeiungen eingetroffen. Zwar war es vor rund 25 Jahren, als man mit den ersten Freisetzungversuchen begann, sicher richtig, auch theoretisch unwahrscheinliche Szenarien in Betracht zu ziehen wie etwa die unerwünschte Anreicherung von Antibiotikaresistenzen in Bodenorganismen oder im menschlichen Verdauungstrakt. Die mit dem Biotechpflanzenanbau in den letzten zwei Jahrzehnten gewonnenen Erfahrungen haben aber zweifelsfrei gezeigt, dass die meisten Befürchtungen grundlos waren. Bestätigt wird dies durch alle behördlichen Zulassungsverfahren und eine überwältigende Fülle molekulargenetischer, biochemischer, ernährungsphysiologischer und ökologischer Studien unabhängiger Forschungseinrichtungen zur Biosicherheit. Sie haben ohne Ausnahme ergeben, dass negative, durch Transgene hervorgerufene Wirkungen des kommerziellen Biotechpflanzenanbaus nicht erkennbar sind. So haben heute viele der noch praktizierten Sicherheitsregeln keine wissenschaftliche Berechtigung mehr, verlängern und verteuern aber die Entwicklung. Z. B. verlangen oder empfehlen viele Zulassungsprotokolle die Eliminierung von Antibiotikaresistenzmarkern aus dem Genom der für den Feldanbau bestimmten Produktionslinien. Beim Goldenen Reis brauchte man 2 Jahre, um transgene Linien zu entwickeln, die den bei den ersten Prototypen verwendeten Hygromycin-B-Resistenzmarker nicht mehr enthielten. Die Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin B wird seit vielen Jahren in der pflanzlichen Gewebekulturtechnik benutzt, um transformierte Pflanzenzellen zu selektieren. Hygromycinresistente Pflanzen gefährden die Umwelt nicht. Außerdem ist das

Antibiotikum in der Human- und Tiermedizin bedeutungslos ([Goldstein u. a., 2005](#)). Kanamycin und verwandte Antibiotika werden zwar zur Therapie mancher Infektionskrankheiten verwendet. Jedoch sind auch kanamycinresistente Pflanzen weder giftig noch umweltschädigend. Resistenzen gegen diese Antibiotika wurden ursprünglich aus Bodenpilzen isoliert, kommen also ohnehin im Boden vor. Zudem ist die theoretische Wahrscheinlichkeit der Übertragung der Resistenzgene von Pflanzen auf andere Organismen gering. In Abwesenheit der Antibiotika hätte der Resistenzerwerb auch keinen Selektionsvorteil. Trotz dieser Sachlage diente der EU-Kommission die Kanamycinresistenz der vom deutschen BASF-Konzern bereits 1996 entwickelten Amflora-Industriekartoffel rund 10 Jahre lang als Begründung, um die Anbauzulassung zu verweigern.

Schon 1987 war in einer Stellungnahme der American Medical Association (AMA) zum oft behaupteten besonderen Gefahrenpotential der Gentechnik zu lesen, dass

- keine Hinweise darauf existieren, dass die Verwendung der DNA-Rekombinationstechnik oder die Übertragung von Genen zwischen nicht verwandten Organismen besondere Gefahren birgt,
- die Risiken, welche die Einführung gentechnisch modifizierter Organismen mit sich bringt, von der gleichen Art sind wie diejenigen, welche mit der Einführung nicht modifizierter oder mit anderen Methoden modifizierter Organismen verbunden sind und
- die Risikobewertung der Freisetzung gentechnisch modifizierter Organismen sich auf die Eigenschaften des Organismus und seiner Umwelt stützen sollte und nicht auf die Methode, mit welcher man ihn produzierte.

Seitdem sind diese Grundregeln vielfach bestätigt und 2012 von der AMA in einer neuerlichen Stellungnahme bekräftigt worden ([AMA, 2012](#)). Vor der Freigabe einer neuen Sorte für den Feldanbau behördlich veranlasste Sicherheitsprüfungen sollten sich deshalb auf mögliche negative Begleitmerkmale der übertragenen Eigenschaften wie Toxizität, Invasionspotential, Unkrautigkeit usw. beschränken. Einfache Transformationsexperimente mit Pflanzen lassen sich gefahrlos im Biologieunterricht von Schülergruppen durchführen. Schüler dänischer Gymnasien erhielten so 2005 kanamycinresistente transgene Pflanzen ([Møller, 2005](#)). Insulin und viele andere Medikamente und Wirkstoffe werden heute fast nur noch gentechnisch hergestellt. Die gesamte molekularbiologisch orientierte biomedizinische Grundlagenforschung ist ohne Gentechnik nicht mehr vorstellbar. Seit Beginn der Kommerzialisierung haben sich mehr als eine Milliarde Menschen und noch weit mehr Nutztiere von transgenem Mais, transgenen Sojabohnen und transgenem Raps ernährt, ohne dass jemals gesundheitliche Beeinträchtigungen oder Umweltschäden bekannt geworden wären, die man dem Biotechpflanzenanbau hätte zuordnen können. Wenn dennoch mit der Gentechnik verbundene Risiken und Gefahren nicht erkennbar geworden sind, lässt sich dies angesichts des immensen Datenmaterials nicht dadurch erklären, dass nicht lange und gründlich genug danach gesucht worden wäre, wohl aber damit, dass sie nicht existieren. Auf einer Jahreskonferenz der schwedischen Bertebos-Stiftung brachte man es wieder einmal auf den Punkt ([Potrykus, 2008](#)):

"Die mit Hilfe der Gentechnik vorgenommenen genetischen Modifizierungen sind, verglichen mit denen, welche die traditionelle Züchtung bewirkt, geringfügig, präzise vorhersagbar und bestens untersucht.

Es gibt keine wissenschaftliche Rechtfertigung besonderer behördlicher Zulassungsverfahren speziell für gentechnisch veränderte Organismen.

Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse aller Zulassungsverfahren, eine überwältigende Zahl von Veröffentlichungen unabhängiger wissenschaftlicher Einrichtungen und alle Daten der Biosicherheitsforschung der letzten 25 Jahre.

Die gegenwärtigen Genehmigungsprozeduren ignorieren die Vorzüge (Anm.: der Gentechnik), sind besessen von hypothetischen Risiken und eine opportunistische Antwort an die Anti-GMO-Aktivisten. Sie behindern den Einsatz der Gentechnik in Forschung und Entwicklung zum Wohl der Allgemeinheit."

So überrascht es nicht, dass die in Deutschland seit Jahren mit massiver staatlicher Förderung betriebene biologische Sicherheitsforschung, die das Ziel verfolgt, systemimmanente Risiken der Agrogentechnik zu entdecken, ergebnislos geblieben ist. Das vorausgesetzte generelle Gefahrenpotential existiert nicht, und so fehlt ihr eine brauchbare Arbeitshypothese. Auch fehlt es an Originalität, da man sich Fragen stellt, welche die internationale Biosicherheitsforschung, die den kommerziellen Biotechpflanzenbau von Anfang an begleitete, bereits beantwortet hat. Sie existiert, weil sie gefördert wird und wissenschaftliche Kriterien bei der Förderung keine Rolle spielen. Wirkungslos ist sie deshalb nicht. In den Augen der Öffentlichkeit liefern die von der deutschen

und europäischen Forschungsbürokratie regelmäßig initiierten Forschungsprojekte zur Biosicherheit ebenso wie Genehmigungsverfahren, die nahezu jeden beim Stand der Technik möglichen Sicherheitstest zur Voraussetzung für den Anbau einer neuen Biotechsorte machen allein durch ihre Existenz den lebendigen Beweis dafür, dass die Agrogentechnik eine nicht zuverlässig beherrschbare Risikotechnik sei. Wozu sollte der enorme Aufwand gut sein, wenn nicht zur rechtzeitigen Erkennung und Abwehr drohender Gefahr? Bezahlen können ihn nur große internationale Konzerne. Kleinere und mittelgroße Saatguthersteller werden auf diese Weise ebenso von der Produktentwicklung ausgeschlossen wie öffentliche Forschungseinrichtungen. So wird verständlich, warum bisher alle kommerziell angebauten Biotechpflanzen von großen Saatgutkonzernen auf den Markt gebracht wurden. Die Zulassungspraxis bewirkt die Monopolisierung des Saatgutmarkts, was von denen am lautesten beklagt wird, die letztere durch die Forderung nach immer mehr Sicherheitsforschung und immer schärferen Sicherheitsvorkehrungen verursacht haben. Über die wirtschaftlichen Folgen wird noch zu reden sein.

1.5 Die Antigentechnikbewegung - Ursprünge und Folgen

Man kann alle eine Zeit zum Narren halten.

Manche kann man alle Zeit zum Narren halten.

Man kann aber nicht alle alle Zeit zum Narren halten.

Abraham Lincoln

1.5.1 Geschichte

1.5.1.1 Die Asilomar-Konferenz über rekombinierte DNA

Im Februar 1975 trafen sich rund 140 Biologen und andere Fachleute im Konferenzzentrum Asilomar State Beach in Kalifornien zur "Asilomar Conference on Recombinant DNA". Der amerikanische Biochemiker Paul Berg, der 1980 zusammen mit Walter Gilbert und Frederick Sanger den Nobelpreis für Chemie erhielt, hatte die Konferenz im Auftrag der National Academy of Science (NAS) organisiert. Berg arbeitete 1974 mit der DNA des Affenvirus SV40, die er mit Hilfe der 1970 entdeckten Restriktionsenzyme an definierten Stellen der SV40-DNA-Sequenz in Bruchstücke (Restriktionsfragmente) zerlegen konnte. Eine andere Klasse von Enzymen, die Ligasen, ermöglichte es ihm, Restriktionsfragmente des SV40-Genoms mit solchen des Bakteriophagen lambda zu verknüpfen. Der letzte Schritt seines experimentellen Plans bestand darin, die rekombinierte Phagen-DNA in einen Laborstamm des Bakteriums *Escherichia coli* einzuführen. Er wurde zunächst nicht durchgeführt. Mehrere Kollegen hatten Berg gebeten, damit zu warten, bis man die möglichen Folgen besser beurteilen konnte. Man wußte, dass der SV40 bei Mäusen Tumore verursachen kann. Zudem ist *E. coli* ein ständiger Bewohner des menschlichen Verdauungstrakts. Man fürchtete deshalb, dass der letzte Schritt, der mit der Vervielfältigung (Klonung) der rekombinierten SV40-DNA gleichbedeutend war, außer Kontrolle geraten und das Laborpersonal infizieren würde. Alle DNA-Rekombinationsexperimente wurden darauf vorerst eingestellt, und es wurde unter Führung der NAS beschlossen, eine internationale Konferenz einzuberufen, welche die neu aufgetauchten Sicherheitsfragen zum Gegenstand haben und Sicherheitsrichtlinien erarbeiten sollte, die bei DNA-Rekombinationsexperimenten künftig zu beachten waren. Viele dieser Empfehlungen sind noch heute Bestandteil guter Laboratoriumspraxis. Bald nach der Asilomarkonferenz wurden die DNA-Rekombinationsexperimente wieder aufgenommen. Was folgte, war ein enormer Aufschwung der biomedizinischen Forschung, der von einer ebenso gewaltigen Erweiterung des Wissen über fundamentale Lebensprozesse begleitet war. Parallel dazu kam es zum Aufblühen der industriellen Biotechnologie. Insulin und viele andere Wirkstoffe und Medikamente werden heute fast nur noch gentechnisch hergestellt. Im Februar 2009 genehmigte die amerikanische Gesundheitsbehörde (FDA) die klinische Verwendung von ATryn, eines aus der Milch transgener Ziegen gewonnenen menschlichen Blutgerinnungsfaktors (Antithrombin). Nach Angaben des Herstellers kann eine transgene Ziege innerhalb eines Jahres dieselbe Antithrombinmenge liefern wie 90'000 Blutspenden. Man benötigt das Antithrombin zur vorbeugenden Behandlung von Patienten mit Antithrombinmangel, denen eine Operation oder eine Entbindung bevorsteht. Es ist das erste Medikament, das von transgenen Tieren geliefert wird.

Bald nach der Wiederaufnahme der DNA-Rekombinationsforschung tauchte in den Medien der Frankenstein-Mythos auf, der bis heute Teile der Gesellschaft prägt und ihre Haltung zur Gentechnik bestimmt. Frankenstein II. erblickte das Licht der Welt, der Popanz des gekauften Wissenschaftlers, der in hermetisch von der Öffentlichkeit abgeschotteten Laboratorien globaler Großkonzerne verantwortungslos mit den Elementarbausteinen des Lebens hantiert, sich über die Natur und ihren Schöpfer stellt und es bei seiner Tätigkeit in Kauf nimmt, versehentlich ein Monster zu erschaffen. Der Kampf gegen die Gentechnik wurde zum Instrument der Politik, und wo ihre Gegner Entscheidungsbefugnisse bekamen, folgten Worten bald auch Taten.

1.5.1.2 Gentechnische Insulinproduktion bei Hoechst

1982 entwickelte die Firma Hoechst (heute Sanofi-Aventis) ein Verfahren, mit dem durch gentechnisch veränderte Bakterien die Herstellung von Humaninsulin gelang. Der weltweit steigende Bedarf an Insulin konnte jetzt mit einem hochreinen Produkt gedeckt werden, das mit dem menschlichen Insulin identisch war. Doch wurde der Firma Hoechst vom damaligen hessischen Umweltminister (Die Grünen) die Lizenz verweigert, das Verfahren zur Herstellung von Insulin in Deutschland zu nutzen. Dies bedeutete damals nicht nur das Aus für das Insulinverfahren, sondern für die gesamte Gentechnik und die auf sie angewiesene industrielle Biotechnologie. Hierdurch sollte Deutschland den Anschluss an internationale Spitzenforschung auf diesem Gebiet für Jahrzehnte - bis in die heutige Zeit - verlieren. Hoechst musste das Verfahren nach Frankreich auslizenzieren,

und das dann im Elsaß gentechnisch hergestellte Insulin wurde nach Deutschland zurückimportiert. Zugelassen war gentechnisch gewonnenes Humaninsulin in Deutschland schon seit 1987. Erst 1999 konnte die aus Hoechst hervorgegangene Aventis in Deutschland eine gentechnische Anlage in Betrieb nehmen. Heute hat das gentechnisch gewonnene Humaninsulin das tierische Insulin fast völlig vom Markt verdrängt ([Reiser, 2007](#)).

1.5.1.3 Die Amflora-Kartoffel der BASF

Nicht viel besser erging es dem deutschen Chemiekonzern BASF mit seiner Amflora-Kartoffel. Amflora ist der Markenname einer vom Plant-Science-Bereich der BASF entwickelten transgenen Kartoffelsorte, deren Stärkezusammensetzung verändert wurde. Pflanzliche Stärke besteht aus zwei verschiedenen Formen, Amylose und Amylopektin. Bei der Kartoffel beträgt das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin etwa 1:4. Beide Stärkeformen haben unterschiedliche Eigenschaften: Während Amylose geliert, kann Amylopektin verdicken und verbinden. Die Kleistereigenschaften des Amylopektins werden in vielen Produkten genutzt. Daher ist diese Stärkeform häufiger nachgefragt. Die Amflora-Stärke besteht nur aus Amylopektin. Amylopektin wird in der Papier- und Textilstoffindustrie sowie bei der Kleb- und Baustoffherstellung verwendet. Aus Amylose lassen sich biologisch abbaubare Folien und Filme herstellen. Vor jeder industriellen Verwendung muss die Kartoffelstärke in diese beiden Komponenten getrennt werden. Dies geschah früher unter hohem Verbrauch von Energie und Wasser. Heute ist es auch möglich, die gewünschte Stärkeform über eine chemische Modifikation zu erzeugen. Da Amflora ausschließlich Amylopektin bildet, könnte die Verwendung den Verarbeitungsschritt der Stärketrennung bzw. -modifizierung überflüssig machen.

Das Zulassungsverfahren für Amflora begann mit dem Antrag auf Zulassung im August 1996. Bis Anfang 2010 waren in der EU weder der Anbau, noch die daraus hergestellten Produkte erlaubt. Obwohl die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) die Amflora-Kartoffel mehrfach als "sicher für die Umwelt sowie die menschliche und tierische Gesundheit" eingestuft hat, konnte sich die EU-Kommission nicht auf eine Zulassung verständigen. Nach Angaben des Herstellers entging den europäischen Landwirten durch die Hinauszögerung des Anbaus jährlich ein potentieller Mehrwert von über 100 Mio. €. Dem Unternehmen entgingen Lizenzeinnahmen von 20 - 30 Mio. € für jedes verlorene Anbaujahr. Im Juli 2008 reichte BASF Plant Science, welche die Zulassung bereits im Jahre 2007 erwartet und den kommerziellen Anbau vorbereitet hatte, beim Europäischen Gerichtshof eine Untätigkeitsklage gegen die EU-Kommission ein. Nach Ansicht des Unternehmens wurde das Zulassungsverfahren für den Anbau der Amflora-Kartoffel von der EU-Kommission jahrelang verzögert ([BASF, 2008](#)). Zur Verhandlung der BASF-Klage vor dem Europäischen Gerichtshof kam es nicht mehr. Am 2. März 2010 hat die EU-Kommission nach 13 Jahre dauerndem Zulassungsprozess den Anbau der Amflora-Kartoffel zugelassen. Es war das erste Mal seit 1998, dass in der EU wieder eine Biotechpflanze zum kommerziellen Anbau zugelassen wurde. Die Kommission genehmigte auch die Verwendung der bei der Stärkeverarbeitung anfallenden Reststoffe als Futtermittel. Als Lebensmittel durften Amflora-Kartoffeln dagegen nicht verwendet werden. Erlaubt waren zufällige Beimischungen bis zu 0,9 %. *"Mir ist deutlich geworden", so der für Gesundheit und Verbraucherpolitik zuständige EU-Kommissar, "dass es keine weiteren wissenschaftlichen Fragen mehr gibt, die untersucht werden müssten. Alle wissenschaftlichen Aspekte und besonders die Sicherheitsbedenken sind bereits ausgiebig berücksichtigt worden. Eine weitere Verzögerung bei der Zulassung wäre nicht zu rechtfertigen gewesen"* ([EU-Kommission 2010](#)). Nach der Zulassung sollte die Kartoffel 2010 zunächst zur Saatgutproduktion auf 150 ha in Tschechien, 80 ha in Schweden und 20 ha in Mecklenburg-Vorpommern angebaut werden. Die Anbauversuche sind jedoch weitgehend gescheitert. Die meisten deutschen Anbauflächen wurden vor der Ernte durch auf solche Aktionen spezialisierte Umweltaktivisten zerstört.

Nach diesen Erfahrungen und unter dem Eindruck des Luxemburger Honigurteils (s. u.) hat die BASF im Januar 2012 in einer Pressemitteilung verlauten lassen, dass sie die Entwicklung und Vermarktung aller Produkte, die ausschließlich auf den europäischen Markt ausgerichtet sind, einstellen und ihre Aktivitäten im Bereich der Pflanzenbiotechnologie künftig auf die Hauptmärkte in Nord- und Südamerika und die Wachstumsmärkte in Asien konzentrieren werde ([BASF, 2012](#)). Die Unternehmenszentrale der BASF Plant Science wurde von Limburgerhof/Deutschland, nach Raleigh, North Carolina, USA, verlegt. Bereits angelaufene Zulassungsprozesse wurden zunächst weitergeführt, ein Anbau in Europa jedoch nicht mehr angestrebt. Dies betraf die transgenen Stärkekartoffeln (Amflora, Amadea und Modena), die gegen Kraut- und Knollenfäule resistente Kartoffel Fortuna, eine gegen Kraut- und Knollenfäule resistente Stärkekartoffel und eine Weizensorte, die resistent gegen Pilzbefall ist. Im Januar 2013 zog das Unternehmen auch die bei den europäischen Zulassungsbehörden noch laufenden Zulassungsanträge für transgene Kartoffelsorten zurück. Begründet wurden die Unternehmensentscheidungen mit den zu erwartenden Feldzerstörungen und der in Deutschland und weiten

Teilen Europas fehlenden Akzeptanz bei der Mehrheit der Verbraucher, Landwirte und Politiker. "Daher ist es aus unternehmerischer Sicht nicht sinnvoll, in Produkte, die für die Kommerzialisierung ausschließlich in diesem Markt vorgesehen sind, weiter zu investieren". Im Dezember 2013 hob der Europäische Gerichtshof (EuGH) die Zulassung der Amflora-Kartoffel auf, nachdem die ungarische Regierung dagegen geklagt hatte und begründete die Entscheidung mit Verfahrensfehlern bei der Zulassung durch die EU-Kommission ([Transgen, 2016a](#)).

Zeitgleich mit ihrem Zulassungsbeschluss hatte die EU-Kommission mitgeteilt, dass der Biotechpflanzenanbau in der EU neu geordnet werden sollte und vorgeschlagen, die Mitgliedstaaten künftig selbst entscheiden zu lassen, ob sie den Anbau einzelner Sorten zulassen wollen oder nicht. Der Vorschlag konnte zunächst nicht verwirklicht werden, da es die Mehrheit der EU-Mitgliedstaaten ablehnte, die Verantwortung für neue Zulassungen zu übernehmen, wurde aber 4 Jahre später vom EU-Parlament übernommen, welches im Januar 2015 beschloss, dass EU-Länder den Anbau von Biotechpflanzen in ihrem Hoheitsgebiet auch dann einschränken oder verbieten dürfen, wenn diese auf EU-Ebene zugelassen sind ([EU-Parlament, 2015](#)). Bislang war dies nur unter Berufung auf neue wissenschaftliche Erkenntnisse möglich gewesen. Von diesem Recht hatte die deutsche Regierung im Frühjahr 2009 Gebrauch gemacht, als sie den Anbau von MON-810-Mais unter Berufung auf neue Erkenntnisse zu Umweltrisiken verbot. Wenig später kam eine Gruppe französischer Wissenschaftler nach erneuter Analyse der Datenbasis zu dem Ergebnis, dass das Verbot wissenschaftlich nicht zu rechtfertigen ist. Seine Begründung verkennt den sehr unterschiedlichen Aussagewert von Labor- und Feldstudien, verwechselt hypothetische mit empirisch nachgewiesenen Risiken und ignoriert den größten Teil der einschlägigen Fachliteratur ([Ricroch u. a., 2010](#)).

Während das Bedürfnis deutscher Politiker, die Agrogentechnik zu verhindern ursprünglich nur das Alleinstellungsmerkmal einer Umweltpartei war, ist es heute parteiübergreifend. Als in den USA die Markteinführung von ATryn begann, verkündete in München der damalige bayrische Umweltminister (CSU) die Beendigung aller Freilandversuche mit transgenen Pflanzen in Bayern innerhalb eines Jahres. Künftig sollen nur noch Gewächshausversuche durchgeführt und nur noch Sicherheitsfragen untersucht werden, auch letzteres anscheinend ausschließlich im Gewächshaus. Umweltpolitisches Endziel sei das gentechnikfreie Bayern ([NTV, 2009](#)). Die von Grünen und Sozialdemokraten getragene baden-württembergische Landesregierung wollte da nicht zurückstehen und legte im Januar 2013 fest, dass sich Pächter landeseigener Ackerflächen künftig verpflichten müssen, auf diesen nur gentechnikfreie Landwirtschaft zu betreiben ([Landesregierung BW, 2013](#)).

1.5.1.4 So urteilen Gerichte

Die politisch verursachte Blockade der Agrogentechnik ist von der Rechtsprechung gedeckt. Besonders deutlich zeigt dies ein Fall, der erstmals im Mai 2008 vor einem süddeutschen Verwaltungsgericht verhandelt wurde, und bei dem es um die Verkehrsfähigkeit von Honig ging. Obwohl Honig nach der damaligen Rechtslage nicht zu kennzeichnen war, wenn er Pollen transgener Pflanzen enthielt und der mögliche Pollenanteil des europäischen Honigs weit unter dem damals gültigen gesetzlichen Schwellenwert von 0,9% liegt, entschied das Verwaltungsgericht Augsburg im Mai 2008, dass Honig, welcher Pollen der Bt-Maissorte MON810 enthält, grundsätzlich nicht verkehrsfähig sei. Dafür sei eine besondere rechtliche Zulassung erforderlich. Ein Imker, in dessen Honig ein Labor den MON810-Pollen nachgewiesen hatte, sah sich dadurch veranlasst, seine gesamte Jahresernte (300 kg) in einer spektakulären vom Zweiten Deutschen Fernsehen übertragenen Aktion in der Müllverbrennungsanlage Augsburg verbrennen zu lassen ([Bayrische Staatszeitung, 2011](#)).

Der Bayrische Verwaltungsgerichtshof, welcher sich als Folgeinstanz mit der Sache ebenfalls zu befassen hatte, legte den Fall am 26. Oktober 2009 dem Europäischen Gerichtshof vor. Die Luxemburger Richter gaben mit ihrem am 6. September 2011 verkündeten Urteil den Klägern recht und entschieden, dass ein Imker auch geringste Mengen von Transgenfragmenten oder Transpeptiden in seinem Honig nicht zu dulden braucht, falls diese von Biotechpflanzen stammen, die an seinem Produktionsstandort nicht zur Verwendung als Nahrungsmittel zugelassen sind ([EUGH, 2011](#)). Auf MON 810, dessen Anbau und Vermarktung in der EU 1998 zugelassen, in Deutschland danach aber wieder verboten wurde, trifft dies zu. Bisher war man davon ausgegangen, dass Spuren transgenen Materials in konventionellen Lebensmitteln unvermeidlich und nicht zu beanstanden seien. Rechtliche Grundlage dieser Auffassung ist die Verordnung 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates über genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel ([EG, 2003](#)). Dort liest man (Verordnungsgründe, Abs. 24):

"Obwohl manche Unternehmer die Verwendung von genetisch veränderten Lebensmitteln und Futtermitteln vermeiden, kann dieses Material in konventionellen Lebensmitteln und Futtermitteln in sehr kleinen Spuren

vorhanden sein, und zwar wegen des zufälligen oder technisch nicht zu vermeidenden Vorhandenseins bei der Saatgutproduktion, dem Anbau, der Ernte, dem Transport oder der Verarbeitung. In diesen Fällen sollte das Lebensmittel oder Futtermittel nicht den Kennzeichnungsanforderungen dieser Verordnung unterliegen. Zur Erreichung dieses Ziels sollte für das zufällige oder technisch nicht zu vermeidende Vorhandensein genetisch veränderten Materials in Lebensmitteln oder Futtermitteln ein Schwellenwert festgelegt werden..."

Unter wissenschaftlich-technischen Gesichtspunkten betrachtet waren die hier genannten Freistellungs-voraussetzungen beim Augsburger Honig zweifellos gegeben. Die Luxemburger Richter entschieden jedoch, dass der Augsburger Honig zulassungs- und kennzeichnungspflichtig war und verwarfen damit die vom Europäischen Parlament für solche Fälle empfohlene Grenzwertregelung. Begründet wird die Entscheidung im Wesentlichen so:

"Der Pollen ist somit kein Fremdstoff und keine Verunreinigung des Honigs, sondern dessen normaler Bestandteil...Er ist...als "Zutat" im Sinne von Art. 2 Nr. 13 der Verordnung Nr. 1829/2003...einzustufen...Sein Vorhandensein...ist...Folge eines bewussten und gewollten Produktionsprozesses des Imkers...Es geht im Wesentlichen auf das Handeln des Imkers selbst zurück, nämlich auf den materiellen Vorgang des Zentrifugierens, den er zu Erntezwecken durchführt." (EUGH, 2011, Ziffern 77, 79, 88)".

Honigpollen ist also Grundstoff und Zutat zugleich. Lebensmittel, welche aus "GVO" - hier Biotechpflanzen - stammende Zutaten enthalten, sind nach Artikel 3 der Verordnung zulassungs- und überwachungspflichtig. In der Sache ähnlich urteilte auch das deutsche Bundesverfassungsgericht in einem Verfahren, in dem es um die Verfassungsmäßigkeit einzelner die Freisetzung transgener Pflanzen betreffender Bestimmungen des deutschen Gentechnikgesetzes ging (BVerfG, 2010).

Will man sich über die Tragweite des Urteils und des darin verkündeten Nulltoleranzdogmas Gedanken machen, muss man sich die Empfindlichkeit heute zur Identifizierung von Transgenen und Transpeptiden angewandter analytischer Methoden vergegenwärtigen. Die klassische PCR-Technik erlaubt den sicheren Nachweis von 10 identischen aus 100 Bausteinen bestehenden DNA-Molekülen in einem Probenvolumen von 10 Mikrolitern. Diese Konzentration entspricht der Verteilung von ca. 5 g dieser DNA im Volumen des Bodensees. Sieht man das Luxemburger Honigurteil als Grundsatzurteil an, welches als solches für alle Lebensmittel gilt, wird seine konsequente Umsetzung wahrscheinlich nicht nur den europäischen Biotechpflanzenanbau zum Erliegen bringen, sondern auch den Großteil der Agrarimporte aus Ländern, wo Biotechpflanzen kommerziell angebaut werden.

Das einzige Merkmal, in dem sich MON810 von konventionellem Mais unterscheidet, ist die Expression des Bt-Gens und die Insektenresistenz. Sein Proteinprodukt, das cry2Ab-Toxin von *Bacillus thuringiensis*, ist nur für Schmetterlinge giftig und für alle anderen Tiere und den Menschen völlig ungefährlich. Sowohl das Toxin als auch sein Gen, ungiftig wie alle DNA, kommen im Honig, wenn überhaupt, dann nur in geringsten Mengen vor. So fand man in Honigproben, die von kanamycinresistentem, Neomycintransferase (NPT II) exprimierendem transgenem Raps stammten, das NPT-II-Protein in einer Konzentration von 1,61 ng/mg Pollenprotein. Ein 500g-Topf enthielt demnach 0,00125 Mikrogramm (0,0000025 ppm) des Enzyms (OGTRa, 2002). Nach heutigem Erkenntnisstand kann Honig nur gesünder werden, wenn der Pollen von Biotechpflanzen stammt. Im Biotechpflanzenbau werden weitaus weniger Pestizide benötigt als in der konventionellen Agrarproduktion, und deshalb wird dessen Ausdehnung die Pestizidbelastung des Honigs reduzieren.

1.5.1.5 Wer nichts weiß, muss alles glauben

Die Wurzeln der in Deutschland so verbreiteten Ablehnung der Agrotechnik reichen bis tief in das Bildungssystem. Bei 2005 von der EU in Auftrag gegebenen Meinungsumfragen konnten nur 40% der Probanden die Frage, ob gewöhnliche Tomaten und andere Pflanzen DNA enthalten, richtig beantworten. 35% glaubten, dies sei nur bei transgenen Tomaten der Fall und der Rest gab an, es nicht zu wissen. Knapp die Hälfte glaubt, dass der Verzehr von transgenen Pflanzen oder daraus hergestellten Lebensmitteln die Gene des Verbrauchers verändern kann oder hat dazu keine Meinung (Gaskell u. a., 2005). Das hier erkennbare Versagen des Biologieunterrichts ist eine der Folgen der seit Jahrzehnten anhaltenden Verdrängung fachwissenschaftlicher Inhalte durch solche der allgemeinen Bildungs- und Erziehungswissenschaften in der universitären Phase der Lehrerbildung. An baden-württembergischen Universitäten beträgt die Regelstudienzeit für das Lehramt an Gymnasien mit zwei Hauptfächern einschließlich eines Schulpraxissemesters und der Prüfungszeit 10 Semester,

wofür 300 Gutpunkte (credits) vergeben werden. Auf das Hauptfach Biologie entfallen 104 Gutpunkte. Der Rest entfällt auf das zweite Hauptfach und allgemeine Module. Der fachwissenschaftliche Gesamtaufwand, der im Regelfall zum Erwerb der Unterrichtsbefähigung im Fach Biologie an baden-württembergischen Gymnasien erforderlich ist, liegt hiernach bei 3,5 Semestern. Lehramtsstudenten, die Kombinationen nicht verwandter Fächer wählen, erwerben im Laufe ihres Studiums keine weiteren biologischen Fachkenntnisse. Mindestens an den hessischen Gymnasien sind letztere zur Kompetenzvermittlung im Biologieunterricht anscheinend auch nicht mehr erforderlich. Wie in einem Entwurf des Hessischen Kerncurriculums zu lesen war, gliedern sich die im Biologieunterricht zu entwickelnden Schülerkompetenzen in personale Kompetenz, Sozialkompetenz, Lernkompetenz und Sprachkompetenz. Die Fachkompetenz suchte man hier vergebens, da sie gestrichen worden war. *"Hier wird die Handschrift von Bildungsplanern sichtbar, welche die Tradierung wissenschaftlicher Tatsachen und Erkenntnisse an die Jugend kategorisch ablehnen und für hinderlich beim Kompetenzaufbau erklären"* (Klein, 2011).

Je niedriger die naturwissenschaftliche Allgemeinbildung der Bürger ist, desto größer ist die psychologische Wirksamkeit von Ideologien und Vermarktungskonzepten, die auf die Erzeugung und Ausbeutung kollektiver Ängste setzen. Es werden Kampagnen und Protestaktionen inszeniert, die das Ziel haben, die Agrogentechnik als Bedrohung der Natur und der Menschheit darzustellen. Gleichzeitig wird um finanzielle Unterstützung zur Abwehr der angeblichen Bedrohung gebeten. Die eingeworbenen Mittel werden dazu verwendet, Druck auf Regierungen und Zulassungsbehörden auszuüben und weitere Kampagnen zu finanzieren. Man schätzt, dass manche Nichtregierungsorganisationen bis zu 80% ihrer gesamten Einnahmen mit diesem Geschäftsmodell, einem sich selbst verstärkenden Rückkopplungsmechanismus von Angsterzeugung und Angstverwertung, akquirieren (Potrykus, 2008). Direkte und indirekte Subventionen, welche die europäischen Regierungen in diesen Zyklus pumpen und die steuerlichen Vorteile, welche der Status der Gemeinnützigkeit mit sich bringt, tun ein Übriges.

Die zweite Behauptung des Lincoln-Zitats bedarf keiner besonderen Begründung, und schließlich zeigen die Diagramme (Abb. 1, 2), dass auch die dritte richtig ist: Jahrelang zeigte der globale Biotechpflanzenanbau zweistellige Zuwachsraten, die erst dann zurückgehen, wenn der Anteil der Biotechsorten die Sättigung erreicht. Zwar zeigt die deutsche Geschichte der Gentechnik und ihrer Anwendungen, dass durch Protestkampagnen und Verbote die Einführung moderner biotechnischer Produktionsverfahren jahrzehntelang verzögert werden kann; dauerhaft verhindern lassen sie sich damit nicht. Ihre Vorteile sind zu offensichtlich, und ihr Potential ist viel zu groß.

1.5.2 Folgen

1.5.2.1 Deutschland und Europa

Wer zu spät kommt, den bestraft das Leben
Michail Gorbatschow

Aus Verbrauchersicht hat der Verzicht auf Gentechnik im Agrarbereich bisher keine negativen Folgen, weil die meisten Biotechpflanzen der ersten Generation ernährungsbiologisch von gewöhnlichen nicht unterscheidbar sind. Er hat aber nachweisbare Nachteile für die Umwelt und die Landwirtschaft. Der Einsatz von Herbiziden und Insektiziden wird durch den Biotechpflanzenbau drastisch reduziert. In Westkanada, wo im Jahr 2000 auf 55% der 5 Mha des mit Raps bebauten Ackerlands transgener Raps kultiviert wurden, sind 6 Millionen kg weniger Herbizide eingesetzt worden als vor der Einführung der Biotechrapsvarietäten. Die Farmer konnten gleichzeitig mehr als 31 Millionen Liter Dieselöl einsparen, weil sie ihre Ackerschlepper seltener einsetzen mussten. Dies bedeutete nicht nur die Verminderung der unerwünschten Bodenverdichtung sondern auch die Einsparung von 110'000 t Kohlendioxid.

Nach Schätzungen brauchten in Europa 7,5 Mha weniger mit Pestiziden besprüht zu werden, wenn 50% der mit Mais, Raps, Rüben, Soja und Baumwolle bestellten Flächen mit Biotechsorten bepflanzt würden. Dies bedeutete die jährliche Einsparung von 20 Millionen l Dieseldieselkraftstoff und würde den CO₂-Ausstoß um jährlich 73'000 t reduzieren. Hinzu käme die offensichtliche Einsparung von Agrochemikalien (Phipps & Park 2002). Weltweit bewirkte der 1996 begonnene Biotechpflanzenbau von 1996 - 2012 die Einsparung von insgesamt 473'000 t Pestiziden. Die im Anbaujahr 2012 mit Biotechpflanzen erzielte Treibstoffersparnis bewirkte die Verringerung des durch die globale Landwirtschaft verursachten CO₂-Ausstoßes um 23,1 Megatonnen (Mt), was etwa der Wegnahme von 10,2 Mio. Kraftfahrzeugen von den Straßen entspricht. Der mit dem Biotechpflanzenanbau seit

dessen Einführung erzielte gesamte Mehrerlös (Tab.9) der globalen Landwirtschaft liegt bei 100 Mrd. USD ([James, 2015](#)).

Zu den wirtschaftlichen und umweltlichen Vorteilen der Agrogentechnik liegen heute zahlreiche wissenschaftliche Studien vor. Ihre vergleichende Bewertung und Zusammenfassung zeigt, dass durch Anbau herbizid-

Land	Mehrerlös (Mrd. USD)	Anbau seit
USA	43,6	1966
Argentinien	14	1996
China	13	1997
Indien	12,6	2002
Brasilien	6,6	2003
Kanada	4	1996
Südafrika	0,922	1998
Paraguay	0,732	2004
Australien	0,607	1996
Philippinen	0,264	2003
Bolivien	0,2	2008
Mexiko	0,18	1996
Uruguay	0,101	2000
Burkina Faso	0,07	2009
übrige	1,32	1996
Welt	98,2	1996
Tab. 9. Mit dem Biotechpflanzenanbau bis 2011 erzielter kumulierter Mehrerlös der Landwirtschaften verschiedener Anbauländer (James, 2015)		

und/oder insektenresistenter Biotechsorten auf den in den 28 EU-Ländern vorhandenen Ackerflächen von insgesamt 102 Mha ein jährlicher Mehrwert von 443 - 929 Mio. EUR erwirtschaftet werden kann (Tab. 10) und die europäischen Landwirte durch Nichtnutzung der Gentechnik Jahr für Jahr einen gleich hohen Gesamtverlust erleiden. Im Wesentlichen resultiert der geschätzte Mehrerlös der Bauernhöfe aus der Vermeidung von Unkräutern und Schädlingen verursachter Ernteverluste bei gleichzeitiger Verringerung des Pestizideinsatzes und nicht daraus, dass die Biotechsorten ertragsstärker sind. So sind kanadischen Studien zufolge die Hektarerträge von konventionellem und herbizidresistentem Raps mit ca. 3,3 t vergleichbar. Konventionelle Rapsfelder müssen aber mindestens zweimal mit Breitbandherbiziden behandelt werden, während beim herbizidtoleranten Raps eine Sprühung mit einem umweltfreundlichen Totalherbizid auf Glyphosat- oder Glufosinatbasis genügt. Die ziemlich hohe Schwankungsbreite der Mehrwertangaben (letzte Spalte der Tabelle) hat mehrere Ursachen. Die Ernten unterliegen witterungsbedingten regionalen und saisonalen Schwankungen. Der Schädlingsbefall variiert von Land zu Land und Jahr zu Jahr. Beim Mais waren im Zeitraum 2004 - 2008 in Deutschland 17 - 28% der Flächen von Schädlingen heimgesucht, in Ungarn 5 - 10% und in Italien 30 - 80%. Neben diesen zufallsbedingten Schwankungen beobachtet man auch systematische Veränderungen. Zum Beispiel breitet sich der Maiszünsler seit Jahren von seinen südliche Befallsgebieten weiter nach Norden aus. Gleiches gilt für den Maiswurzelbohrer, der erst 1992 in Serbien entdeckt und vermutlich während des Balkankrieges aus Nordamerika nach Europa eingeschleppt wurde. Auch die Anbauflächen ändern sich von Jahr zu Jahr. So konnten in den USA 2011 transgene Zuckerrüben nur eingeschränkt angebaut werden, weil ein Gerichtsurteil die Anbauzulassung von weiteren Umweltverträglichkeitsprüfungen abhängig machte. In der EU ging der Zuckerrübenanbau mit der Reform des europäischen

Zuckermarktes, die 2005 wirksam wurde und eine drastische Senkung des Zuckerpreises erzwang, stark zurück. Während 2005 noch auf 2,2 Mha 137 Mt Zuckerrüben geerntet worden waren, waren es 2008 noch 101 Mt auf 1,46 Mha.

Der reale Mehrwert des Biotechpflanzenanbaus dürfte über den Tabellenwerten liegen, da indirekte wirtschaftliche Vorteile wie der verringerte Einsatz der Landmaschinen nicht berücksichtigt sind. Letzterer fällt besonders dann ins Gewicht, wenn der Anbau herbizidtoleranter Pflanzen mit pfluglosen Anbautechniken kombiniert wird, deren großflächiger Einsatz erst mit der Agrogentechnik möglich wurde und die in großen Anbauländern wie den USA oder Argentinien heute weit verbreitet sind. Auch die geringeren Umweltbelastungen gehen nicht in die Berechnungen ein. Gemessen am Wert der gesamten europäischen Agrarproduktion, 389 Mrd. € in 2011 ([AMI, 2013](#)), ist der unmittelbare Mehrwert der Biotechpflanzenproduktion gering. Er wird in Zukunft wachsen, weil

immer mehr und bessere Sorten die Marktreife erreichen und sich, wie die Erfahrung zeigt, auf dem Weltmarkt schon bald nach ihrer Einführung durchsetzen ([Park u. a., 2011](#)).

Im Sommer 2008 kam es in der Oberrheinebene zu einem Bienensterben, das als bisher größter Vergiftungsfall in Deutschland in die Annalen der Bienenhaltung einging. Über 700 Imker mit mehr als 12'000 Bienenvölkern

Ackerfrucht	Anbau- fläche	Merk- mal	Mehrerlös/ha (€/ha)	Mehrwert (Mio. €)
Mais	8,5	IR	8,4 - 39,2	157 - 334
Raps	6,5	HT	30 - 49	195 - 318
Zuckerrübe	1,46	HT	50 - 150	73 - 219
Soja	0,5	HT	10 - 38	5 - 19
Baumwolle	0,26	IR	50 - 150	13 - 39
Summe				443 - 929

Tab. 10. Mehrwert des auf den EU-Ackerflächen möglichen Biotechpflanzenanbaus. IR Insektenresistenz, HT Herbizidtoleranz. Der in Spalte 5 ausgewiesene Mehrwert ist das Produkt aus der in der EU mit der jeweiligen Frucht bestellten Ackerfläche, dem Flächenanteil mit behandlungsbedürftigem Schädlings- bzw. Unkrautbefall und dem in Spalte 4 angegebenem pro ha und Erntezyklus erzielbaren Mehrerlös der landwirtschaftlichen Betriebe. Letzterer ergibt sich aus der Auswertung in Ländern mit jahrelangem Biotechpflanzenanbau gesammelter landwirtschaftlicher Erfahrungen ([Park J. u. a., 2011](#)).

waren betroffen. Als Ursache ermittelte man Abdrift von Clothianidin bei der Aussaat von Clothianidin-gebeiztem Maisaatgut ([MIR, 2008](#)). Die Maßnahme war notwendig geworden, um den 2007 erstmals in Deutschland aufgetretenen Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera*) zu bekämpfen, den weltweit wichtigsten Maisschädling. Bereits 2003 wurde in den USA und in Kanada die gegen mehrere *Diabrotica*-Arten resistente Bt-Maissorte MON863 zum Anbau zugelassen. In einem aus dem Jahre 2005 stammenden Gutachten der amerikanischen Umweltschutzbehörde EPA (US Environmental Protection Agency) liest man zur Umweltverträglichkeit von MON863, "...dass die Benutzung dieses Pestizids (Anm.: mit "Pestizid" ist hier das vom MON863-Mais

gebildete Bt-Toxin gemeint) im öffentlichen Interesse liegt und für die Dauer der Zulassung keinerlei nachteilige Auswirkungen auf die Umwelt zu erwarten sind." MON863 hat inzwischen mehr als ein halbes Dutzend gegen den Maiswurzelbohrer unempfindliche Nachfolger erhalten, die in den USA, Kanada oder Japan zugelassen sind, von denen aber in der EU bisher keiner zum Anbau freigegeben wurde. Wäre dieser Mais in Deutschland angebaut worden, dann hätte man sich die Clothianidinbeize des Saatguts sparen können, die Pestizidbelastung des Honigs wäre geringer gewesen, und die Bienen wären am Leben geblieben.

Die Vorbehalte der europäischen Industrienationen gegenüber der Agrogentechnik schaden dem Wirtschaftsstandort Deutschland. Eine moderne Saatgutindustrie, welche den einheimischen Landwirten die Teilhabe am wissenschaftlich-technischen Fortschritt ermöglichen würde, kann sich in Deutschland nicht entwickeln. Deutsche Saatguthersteller sind durch die Gentechnikgesetze und ihre Handhabung vom internationalen Biotechsaatgutmarkt ausgeschlossen, dessen Volumen 2012 bereits ca. 15 Mrd. USD ([James, 2015](#)) betrug. Bereits heute haben die großen ausländischen Konzerne, vor allem, was Erkenntnisse, die beim Feldanbau gewonnen werden, angeht, einen Entwicklungsvorsprung, der kaum noch einzuholen ist. Ebenso wenig kann sich eine Verarbeitungsindustrie für Nahrungsmittel und nachwachsende Industrierohstoffe entwickeln, welche aus dem einheimischen Biotechpflanzenanbau stammen. Die internationale Konkurrenzfähigkeit der europäischen Landwirtschaft, die ohnehin wirtschaftlich nie auf eigenen Füßen stand, wird durch die Ablehnung der Agrogentechnik geschwächt. In Zukunft werden sich mehr und mehr Landwirte fragen müssen, was sie noch anbauen können, wenn die Verteidigung von Subventionstatbeständen in den überschuldeten Volkswirtschaften Europas nicht mehr wie bisher möglich ist und auf den Weltagarmärkten standortoptimierte im Ausland entwickelte und patentierte transgene Hochleistungssorten dominieren, mit denen die eigene Ernte weder qualitativ noch preislich konkurrieren kann. Europa hat einen großen Teil seiner Futtermittelerzeugung nach Nord- und Südamerika ausgelagert. Jährlich werden etwa 32 Mt Sojabohnen und -schrot aus Nord- und Südamerika in die Europäische Union verschifft - rein rechnerisch sind das 63 Kilogramm für jeden EU-Bürger ([Transgen, 2016b](#)). Der von deutschen Futtermittelherstellern für die Produktion von Ferkelfutter benötigte preisgünstige HP-Sojaschrot (High Protein) z. B. wird fast ausschließlich aus Brasilien

importiert und ist Standard in den meisten Mastbetrieben ([Fuchs, 2015](#)). Brasilien baut fast ausschließlich herbizid- und/oder insektenresistente transgene Biotechsojavarietäten an. Nahezu die gesamte europäische Tierproduktion ist auf importierte Futtermittel angewiesen, die es in gentechnikfreier Form auf dem Weltmarkt bald, wenn überhaupt, dann nur zu weit höheren Preisen geben wird. Auch die Verbraucher werden so die wirtschaftlichen Folgen der jahrzehntelangen Blockade einer zukunftsweisenden Hochtechnologie zu spüren bekommen. Sie werden an Wohlstand verlieren und den weltweiten Siegeszug der Agrogentechnik dennoch nicht aufhalten können. Wenn sie nicht verhungern wollen, wird ihnen bald nichts anderes übrig bleiben, als die Gegenwart von Transgenen in Nahrungs- und Futterpflanzen zu akzeptieren.

1.5.2.2 Entwicklungsländer

Rund 915 Millionen Menschen waren im Jahre 2008 nach FAO-Schätzungen unterernährt ([FAOSTAT, 2016](#)). Das Wachstum der Weltbevölkerung wird nach aktuellen UNO-Projektionen in diesem Jahrhundert im Gegensatz zu bisherigen Annahmen nicht zum Stillstand kommen, und die Erdbevölkerung wird von 6,9 Mrd. Mitte 2011 auf 9,3 Mrd. in 2050 und auf 10,1 Mrd. im Jahr 2100 angewachsen sein ([ESA, 2013](#)). Bei diesen Randbedingungen lässt sich die Versorgungslage in den Entwicklungsländern nur verbessern, wenn alle Möglichkeiten genutzt werden, die geeignet sind, die Nahrungsmittelproduktion zu steigern. Biotechpflanzen sind durchweg besser als konventionelle Sorten und haben einen wesentlichen Anteil daran, dass die Weltnahrungsmittelproduktion zwischen 2000 und 2007 um 15% gesteigert werden konnte. Man schätzt, dass ohne den Einsatz der Agrogentechnik die Weltmarktpreise für Mais, Raps und Soja um 5,8%, 3,8% und 9,6%, die Preise von Futter- und Lebensmittelerivaten dieser Pflanzen um 4-9% höher wären ([Brooks u. a., 2010](#)). Ferner existieren Schätzungen der wirtschaftlichen Nachteile, welche in Entwicklungsländern durch den Verzicht auf den Anbau bereits kommerzialisierter Biotechpflanzen verursacht werden. Den westafrikanischen Baumwollbauern in Mali, Burkina Faso, Benin, der Elfenbeinküste und Senegal entstehen bei Nicht-Anpflanzung insektenresistenter Bt-Baumwolle jährliche Einkommensverluste von zusammengerechnet 20 - 200 Mio. US \$, wobei der Mehraufwand an Insektiziden, den der konventionelle Baumwollanbau erfordert, noch nicht berücksichtigt ist. Die Beschränkung auf konventionelle Sorten würde in diesen Ländern bewirken, dass ihre Baumwolle auf dem Weltmarkt nicht mehr konkurrenzfähig ist ([Cabanilla u. a., 2005](#)). Burkina Faso entschied sich deshalb 2008, 8500 ha mit Bt-Baumwolle zu bepflanzen. Die Einkreuzung der Bollgard-II-Insektenresistenz in einheimische Baumwollsorten bewirkte deutliche und anhaltende Ertragssteigerungen in den Folgejahren, die jedoch von einem qualitätsmindernden Rückgang der Faserlänge begleitet waren. Burkina Fasos Baumwollfarmer machten hierfür die transgene Insektenresistenz verantwortlich und entschlossen sich 2016, den Anbau der Bollgard-II-Baumwolle vorerst einzustellen. Gleichzeitig forderten sie Schadenersatz vom Saatguthersteller ([Reuters, 2016](#)). Ertrag und Faserqualität sind auch bei konventionellen Züchtungsprogrammen gewöhnlich negativ korreliert. Beide Merkmale hängen sowohl von Umweltbedingungen als auch von genetischen Faktoren ab, wobei die Transgene der Bollgard-II-Baumwolle nach den bisher mit dem globalen Anbau gemachten Erfahrungen keine Rolle spielen.

In armen Entwicklungsländern haben Antigentechnikkampagnen, welche in reichen Industrieländern ansässige Organisationen finanzieren, dort wo sie erfolgreich sind, unmittelbare Auswirkungen auf die Volksgesundheit. Vor allem ihnen ist es zu verdanken, dass Goldener Reis viele Jahre lang keine Anbauzulassung erhielt und keine repräsentativen Ernährungsstudien möglich waren, in denen man hätte prüfen können, ob die theoretisch ermittelte Tagesration von 72 g des Goldenen Reis II tatsächlich ausreicht, um bei Kindern den Mangel an Vitamin A auszugleichen. Wenn dies zutrifft, könnte der Anbau allein in Indien jedes Jahr rund 40'000 Menschen vor den tödlichen Folgen des Vitamin-A-Mangels bewahren ([Potrykus, 2008](#)). Ein prominenter Vertreter der US-amerikanischen Umweltbewegung sieht die Aktivitäten dieser Organisationen heute so:

"I daresay the environmental movement has done more harm with its opposition to genetic engineering than with any other thing we've been wrong about. We've starved people, hindered science, hurt the natural environment, and denied our own practitioners a crucial tool. . .when those two organizations (Anm.: Gemeint sind Greenpeace und Friends of Earth) went to great lengths to persuade Africans that, in the service of ideology, starvation was good for them" ([Brand, 2011](#)).

1.5.3 Fazit

- Die politische Blockade der Agrogentechnik ist durch nichts zu rechtfertigen. Sie ignoriert eine immense Fülle mit dem Biotechpflanzenanbau erworbener wissenschaftlicher Erkenntnisse und positiver praktischer Erfahrungen.
- Indem sie Entwicklung und Anwendung moderner Züchtungs- und Produktionsverfahren unterdrückt, behindert sie den Fortschritt und schadet der Produktivität der Landwirtschaft.
- Gentechnikfreie Landwirtschaft verteuert die Lebensmittelproduktion, gefährdet dadurch die Versorgung der wachsenden Weltbevölkerung und erschwert den Kampf gegen Hunger und Unterernährung in vielen Teilen der Welt.
- Sie erzwingt den verstärkten Einsatz umweltbelastender Pestizide und schädigt so Natur und Umwelt.

2 Grundlagen

2.1 Transformationstechnik

Die Züchtung einer marktfähigen Biotechpflanze ist ein komplexer Prozess und dauert Jahre. Voraussetzung ist, dass man die genetischen und biochemischen Grundlagen der Merkmale, die man einführen oder verbessern möchte, einigermaßen kennt und mindestens ein Gen isoliert wurde, von dem man weiß oder aus guten Gründen annimmt, dass seine Expression in einer Nutzpflanze deren Wert verbessern kann. Das ausgewählte Gen kann aus jedem Organismus stammen, auch aus dem Genom des Menschen. Die meisten der in Höheren Pflanzen bisher exprimierten Transgene kodieren Enzyme, z. B. eine glyphosatunempfindliche Form der 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphatsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens*, die Pflanzen, welche dieses Enzym besitzen, tolerant gegenüber Glyphosat als Wirkstoff enthaltenden Totalherbiziden macht. Eine wichtige Ausnahme bilden die insektiziden δ -Endotoxine aus *Bacillus thuringiensis*, die ihre Giftwirkung im Mitteldarm empfindlicher Insekten durch einen nichtenzymatischen Mechanismus entfalten. Auch pflanzliche Membrantransportproteine wie der Na^+/H^+ -Antiporter der Vakuolenmembran von *Arabidopsis thaliana*, die in Modell- und Nutzpflanzen getestet werden und deren Salztoleranz verbessern können, sind keine Enzyme. Neben proteinkodierenden Genen können auch RNA-Gene, z. B. solche regulatorischer Mikro-RNAs, ins Pflanzengenom übertragen werden und dort ihre Funktion ausüben, und es zeichnet sich bereits ab, dass diese RNA-gestützte Technik das Potential der gentechnischen Pflanzenzüchtung wesentlich erweitern wird ([Zhou & Luo, 2013](#)).

Nicht aus Pflanzen stammende Gene müssen vor der Übertragung ins Pflanzengenom mit pflanzlichen Promoter- und Terminatorsequenzen verknüpft werden, da die Expressionssignale bakterieller oder tierischer Gene vom pflanzlichen Proteinsyntheseapparat in der Regel nicht verstanden werden. Bei den historischen Transformationsexperimenten benutzte man hierzu die Promoter- und Terminatorsequenz des Nopalinsynthasegens (*nos*) der T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens*. Der *nos*-Promoter wird, obwohl bakteriellen Ursprungs, von der pflanzlichen RNA-Polymerase II, welche die proteinkodierenden Pflanzengene transkribiert, erkannt, so dass eine *nos*-mRNA synthetisiert und von den pflanzlichen Ribosomen in eine Peptidkette, die Nopalinsynthase II (NPTII), übersetzt werden kann. Viele in Nutzpflanzen exprimierte Transgene sind modifiziert und/oder aus Genfragmenten zusammengesetzt, welche aus verschiedenen Organismen stammen und kommen in der Natur nicht vor. Z. B. besteht das rekombinierte Endotoxingen, dessen Expression der MON863-Biotechmais seine Resistenz gegen den Maiswurzelbohrer verdankt, aus dem 35S-Promoter des Blumenkohlmosaikvirus, der kodierenden Sequenz des *cry3Bb1*-Endotoxingens von *Bacillus thuringiensis* und drei kleineren Sequenzelementen aus Genen von Reis und Weizen. Die einzelnen Sequenzabschnitte, aus denen ein Transgen besteht, werden mit gentechnischen Standardverfahren in *Escherichia coli*-Wirten kloniert und mit Restriktionsenzymen und anderen DNA-Modifizierungsenzymen zu einem linearen DNA-Konstrukt zusammengefügt, welches eine in der Empfängerpflanze expressionsfähige Genkassette bildet. Diese kann in einen der zahlreichen zur DNA-Klonierung in *E. coli* bereitstehenden Plasmidvektoren eingebaut, durch Vermehrung der Bakterien vervielfältigt und aus letzteren in praktisch beliebiger Menge zurückgewonnen werden.

Das weitere Vorgehen hängt vom angepeilten Transformationsverfahren ab. Bei der agrolistischen Transformation wird die Transgenkassette in einen Plasmidvektor eingebaut, der sowohl in dem Standardwirt *E. coli* als auch in Agrobakterienstämmen replikationsfähig ist. Der in *E. coli* klonierte Vektor wird entweder durch bakterielle Konjugation oder durch direkte Transformation von Agrobakterien mit der isolierten Vektor-DNA in einen virulenten Agrobakterienstamm übertragen. Diesen benutzt man dann zur Infektion einer Gewebekultur der Empfängerpflanze. Das zweite verbreitet zur Transformation von Nutzpflanzen eingesetzte Transformationsverfahren ist die biolistische (biologisch-ballistische) Transformation, bei der mikroskopisch kleine Metallpartikel, meist aus Wolfram oder Gold mit der Plasmid-DNA beschichtet und mithilfe einer gewöhnlich Gen- oder Partikelkanone genannten Apparatur in Pflanzengewebe eingeschossen werden. Die Geschwindigkeit der Metallpartikel ist so hoch, dass sie mehrere Zellschichten des Zielgewebes durchdringen können. Bei einem kleinen Teil der behandelten Zellen gelangt die eingedrungene DNA in den Zellkern und wird, wenn sich die beschossenen Zellen in der auf den Beschuss folgenden Gewebekulturphase teilen, in die Chromosomen eingebaut. Neben der Agrolistik und der Biolistik existieren weitere Verfahren zur Transformation von Pflanzen. Bei der Protoplastentransformation wird das Zielgewebe mit Pektinasen und Zellulasen behandelt, wobei die aus Zellulose und Pektinen aufgebauten pflanzlichen Zellwände abgebaut werden und der Gewebeverband aufgelöst wird. Man erhält teilungsfähige zellwandlose Protoplasten, die nur noch durch die Zellmembran

zusammengehalten werden. Die Input-DNA wird der Protoplastenkultur zugefügt, welche entweder mit Polyethylenglykol versetzt oder, bei der Elektroporation, mit kurzen Stromstößen behandelt wird. Damit wird die Protoplastenmembran durchlässig für die DNA gemacht. Die Methode ist zwar bei allen Pflanzen anwendbar, ist aber in der kommerziellen Biotechpflanzenzüchtung bisher nur selten angewandt worden. Die Transformationseffizienz ist zu gering und die Regeneration kompletter Pflanzen aus Protoplasten zu schwierig.

An die Transformation schließt sich ein Selektionsprozess an, der das Ziel hat, nicht transformierte Zellen am Wachstum zu hindern und ein homogenes Gewebe zu liefern, das keine nicht transformierten Zellen mehr enthält. Dieses bildet das Ausgangsmaterial eines physiologischen Regenerationsprozesses, welcher schließlich eine komplette transgene Pflanze liefert. Somit lassen sich drei Phasen erkennen: Die Transformation, die Züchtung homogenen transgenen Gewebes und die Regeneration kompletter Pflanzen. Die Regeneration ist am schwierigsten, dauert am längsten und ist auch nicht bei allen Pflanzen möglich. Bei den Getreidearten war sie lange Zeit das entscheidende methodische Hindernis.

Stabil transformierte Pflanzen tragen mindestens ein stabil integriertes Transgen in ihrem Genom, welches sich nach den Mendelschen Regeln auf die Nachkommen vererbt. Bei der transienten Transformation entfällt die Regeneration. Sie eignet sich zum Studium von Prozessen, wo keine Integration des Transgens ins Pflanzen-genom erfolgen muss, z. B. des Expressionsverhaltens eines neuen Genkonstrukts oder der subzellulären Lokalisierung eines Transproteins und seiner Interaktionen mit Proteinen des Wirtsgewebes. So lässt sich beispielsweise feststellen, ob ein Transprotein nach seiner Synthese an den pflanzlichen Ribosomen im Cytoplasma verbleibt, in den Zellkern wandert oder in die Zellmembran eingebaut wird.

2.1.1 Regenerative Transformationsverfahren

2.1.1.1 Agrolistik

Biologie von Agrobacterium tumefaciens

Agrobakterien sind im Boden lebende gramnegative Bakterien. Sie sind überwiegend harmlos und ernähren sich saprophytisch von im Boden vorhandenen organischen Substanzen. Vier Agrobakterienarten sind phytopathogen und erzeugen an den befallenen Pflanzen neoplastische (krebsartige) Erkrankungen: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* und *A. vitis*. *Agrobacterium tumefaciens* ist weitaus am wichtigsten und am besten studiert. Es ist der Verursacher der Wurzelhalsgallen; das sind geschwulstartige Gewebewucherungen, welche von befallenen Pflanzen gebildet werden. Oft entstehen sie am Wurzelhals, der Stelle, wo die Hauptwurzel der Pflanze in den Spross übergeht. Die an der Infektionsstelle entstehenden Tumore entstehen aus Kambiumzellen, welche sich nach der Infektion nicht mehr in normales Leitgewebe differenzieren können, was den Wasser- und Nährstofftransport behindert. In extremen Fällen führt dies zum Tod der Pflanze. Zum Wirtsbereich von *Agrobacterium* gehören mehrere hundert zweikeimblättrige (dikotyle) Kräuter, Stauden und Holzgewächse, aber auch einige einkeimblättrige (monokotyle) Pflanzen. Die Wurzelhalsgallenkrankheit wurde 1853 erstmals beschrieben. 1907 erkannte man, dass sie durch ein Bakterium verursacht wird. Einmal entstanden wuchsen die Tumoren auch in Abwesenheit der Bakterien, weshalb schon früh vermutet wurde, dass die infizierten Pflanzengewebe von den Bakterien genetisch transformiert werden. In den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts entdeckte man, dass die Umwandlung normaler Pflanzenzellen in Tumorzellen stattfindet, wenn bakterielle Gene ins Genom der Wurzelhalszellen übertragen werden. *Agrobacterium tumefaciens* wurde so zu einem Modellsystem für den horizontalen (zwischenartlichen) Gentransfer und zum wichtigsten Transformationssystem für Pflanzen.

Agrobakterien sind die einzigen bekannten Organismen, die Gene zwischen verschiedenen Organismenreichen übertragen können. Seit etwa 1980 ist der Mechanismus der Tumorbildung im wesentlichen bekannt. Krankheitserregende (virulente) Agrobakterienstämme besitzen Gene, die avirulenten Stämmen und anderen Bakterienarten fehlen und die für die Tumorbildung nötigen Proteine kodieren. Diese Gene liegen in drei Gruppen auf einem ca. 200 kbp (Kilobasenpaare) großen Plasmid, dem Ti-Plasmid (Tumor inducing, Abb. 8). Die Gene der ersten Gruppe bilden eine DNA-Region, die T-DNA (Transfer-DNA), welche in infizierte Zellen eingeschleust und in deren Chromosomen eingebaut wird. Von nun an wird die T-DNA wie ein Pflanzengen bei jeder Zellteilung vererbt. Auf der T-DNA liegen zwei Genregionen, die primären und die sekundären Onkogene. Die Expression der primären Onkogene im Wirt bewirkt die Produktion von Enzymen, die Pflanzenhormone synthetisieren. Die Hormone veranlassen die infizierten Zellen, sich vermehrt zu teilen und bewirken so das Tumorstadium. Die Expression der sekundären Onkogene liefert die Enzyme für die Opinsynthese. Opine sind

aus jeweils einer Aminosäure und einem Zucker aufgebaute Verbindungen, die von den Tumorzellen ausgeschieden werden und den Agrobakterien als Kohlenstoff- und teilweise Stickstoffquellen dienen. Da die meisten anderen Mikroorganismen Opine nicht verwerten können, verleihen diese den Agrobakterien einen

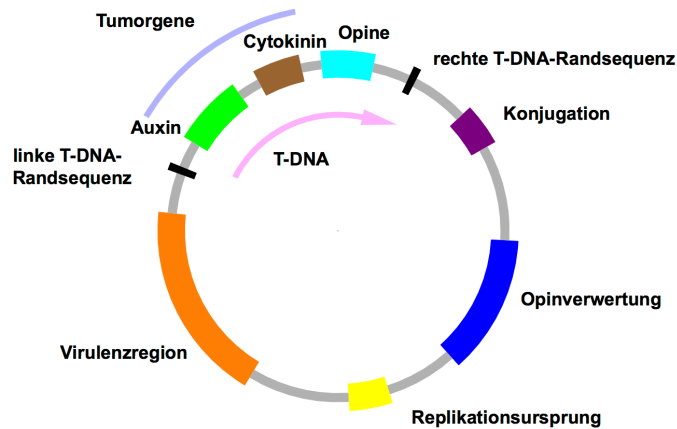


Abb. 8. Grundstruktur eines Ti-Plasmids. Ti-Plasmide sind ca. 200 Kilobasenpaare große ringförmige DNA-Doppelstränge.

Wachstumsvorteil. Die Gene der zweiten Gruppe des Ti-Plasmids, die Virulenzgene (*vir*), kodieren ca. 35 Proteine, welche für die Übertragung der T-DNA, ihre Verschiebung in den Zellkern und ihren schließlichen Einbau ins Pflanzengenom notwendig sind. Eine dritte Genregion des Ti-Plasmids trägt Gene, welche zur Aufnahme und Verwertung der Opine benötigt werden. Vom Ti-Plasmid wird ausschließlich die T-DNA in die Pflanzenzelle übertragen. Alle seine anderen Gene verbleiben in der Bakterienzelle.

Agrobakterien sind im Boden weit verbreitet. Die meisten haben kein Ti-Plasmid und können unabhängig von Pflanzen leben. Virulente Stämme, welche ein Ti-Plasmid besitzen, exprimieren die *vir*-Gene mit nur zwei Ausnahmen, *virA* und *virG* nicht, solange die Bakterien nicht zusammen mit Pflanzenzellen kultiviert werden, welche die als Induktoren der *vir*-Expression wirkenden

Signal-moleküle ins Medium abgeben. Die dann folgende Anheftung des Bakteriums an die Wirtszelle wird von 4-5 Genen gesteuert, die nicht auf dem Ti-Plasmid, sondern auf dem Bakterienchromosom liegen. Nach der Induktion der *vir*-Expression und der Anheftung an eine Wirtszelle bildet das Bakterium einen aus den Proteinen VirB und VirD4 aufgebauten Membrantransportkomplex, welcher es der T-DNA und mehreren weiteren Vir-Proteinen, darunter VirD2 und VirE2, ermöglicht, die bakteriellen und pflanzlichen Zellmembranen und -wände zu durchqueren und ins Zytoplasma der Wirtszelle zu gelangen. Wie dies im Detail bewerkstelligt wird, ist unbekannt. Abb. 9 zeigt ein vereinfachtes Modell des Transformationsprozesses. VirD2 und VirE2 tragen in Pflanzen wirksame Kernlokalisierungssignale (NLS-Sequenzen, nuclear localizing sequences). Sie bewirken den intrazellulären Transport der T-DNA vom Zellplasma in den Zellkern. VirE2 bedeckt die T-DNA. Möglicherweise schützt es diese vor dem Angriff pflanzlicher cytoplasmatischer Exonukleasen. Das Protein vermag sich in künstliche biologische Membranen einzusetzen und Kanäle zu bilden und hat wahrscheinlich auch Funktionen beim Membrantransport der T-DNA. VirD2 ist kovalent an das 5'-Ende der T-DNA gebunden und hat vermutlich ähnlich wie VirE2 eine Schutzfunktion, indem es die T-DNA vor dem Angriff pflanzlicher Exonukleasen schützt. Das Protein trägt 2 NLS-Regionen, die beide rekombinierte Proteine in den Kern lenken können. Die T-DNA tritt als Einzelstrang in den pflanzlichen Zellkern ein und wird wahrscheinlich vor der Integration zum Doppelstrang ergänzt. Wie sie in die chromosomale DNA eingebaut wird, ist weitgehend ungeklärt. Wahrscheinlich geschieht dies im Zusammenwirken des am Ende des T-DNA-Strangs gebundenen virD2 mit Pflanzenproteinen.

Der Angriff von *Agrobacterium* bewirkt in der Pflanze eine ausgiebige Reprogrammierung der Genexpression. Viele durch den Kontakt mit *Agrobacterium* induzierten Gene sind Teil der Pathogenabwehr und pflanzlicher Stressreaktionen. Die Expression von Abwehrgenen ist mit dem Transformationserfolg negativ korreliert, was dafür spricht, dass der T-DNA- und *vir*-Transfer nach erfolgter Anheftung die Abwehrreaktion der Pflanze zu unterdrücken vermag. Aus diesen Gründen ist *Agrobacterium* nicht nur als Mittel zur Transformation von Kulturpflanzen von Interesse sondern auch als Modellsystem zum Studium der Wechselwirkungen zwischen Pathogen und Wirt und des Transports aus dem Pathogen stammender Makromoleküle in die Zielzellen ([Pitzschke & Hirt, 2010](#)).

Agrolistische Transformation von Pflanzen

Das jahrelange intensive Studium der Ti-Plasmide und des Infektionsprozesses lieferte zwei für die Nutzung von *Agrobacterium* als Transformationssystem entscheidend wichtige Entdeckungen: 1. Zur erfolgreichen Über-

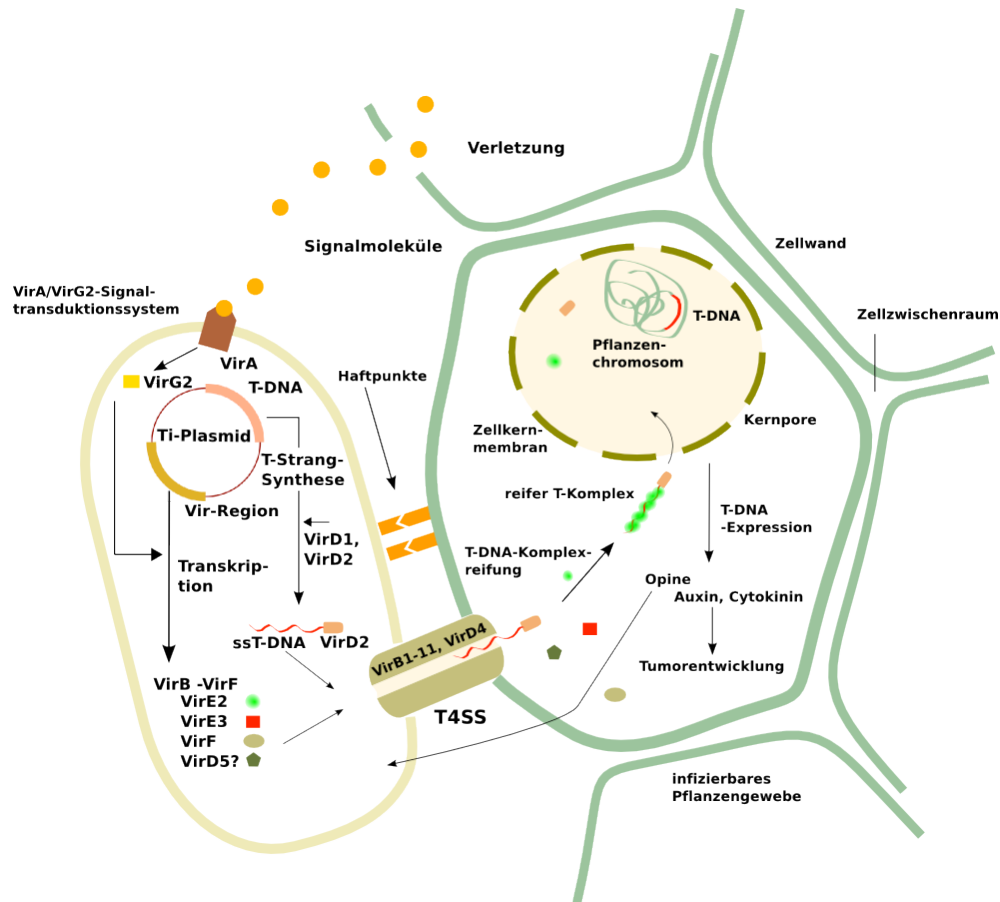


Abb. 9. Einfaches Modell des agrobakteriellen Transformationsprozesses. Agrobakterien besitzen Membranrezeptorsysteme, die von verletzten Pflanzenzellen freigesetzte Signalmoleküle wahrnehmen können. Von diesen werden die Bakterien angelockt, wandern chemotaktisch zu den verwundeten Zellen und heften sich an diese an. Die molekularen Grundlagen von Chemotaxis und Anheftung sind nicht im Detail geklärt. Diese Prozesse werden von Genen des Bakterienchromosoms gesteuert. Sie benötigen kein Ti-Plasmid, sind jedoch Voraussetzung für die T-DNA-Übertragung und die Transformation. Der eigentliche Transformationsprozess beginnt mit der Wahrnehmung von verletzten Pflanzenzellen abgegebener niedermolekularer phenolischer Verbindungen durch ein aus zwei konstitutiv exprimierten Vir-Proteinen, VirA und VirG bestehendes Signalübertragungssystem. Nach Bindung eines Signalmoleküls aktiviert der membranständige VirA-Rezeptor den Transkriptionsfaktor VirG, welcher die Transkription der übrigen Gene der Virulenzregion des Ti-Plasmids auslöst. VirD1 und VirD2 arbeiten an der T-DNA-Region und produzieren einen komplementären T-DNA-Einzelstrang, an dessen 5'-Ende VirD2 kovalent gebunden bleibt. Gleichzeitig wird in der Bakterienzelle ein aus VirD4 und den Vir-Proteinen B1-B11 bestehender membranständiger Transportkomplex (T4SS) aufgebaut, welcher die bakteriellen und pflanzlichen Zellmembranen und -Wände durchspannt und eine Transportverbindung zwischen den Zellen herstellt. T4SS ist ein bakterielles Sekretionssystem vom Typ 4. Der noch unfertige T-DNA-Komplex und einige weitere Vir-Proteine wandern nun durch den T4SS-Sekretionskanal ins Plasma der Pflanzenzelle, wo das T-DNA-VirD2-Konjugat durch Assoziierung mit VirE2-Molekülen zum reifen T-DNA-Komplex vervollständigt wird. Die Membrantranslokation des T-Komplexes ist energiebedürftig und verbraucht Adenosintriphosphat (ATP). VirD2 und VirE2 schützen vermutlich die T-DNA vor dem Abbau durch pflanzliche Nukleasen. Sie tragen Kernlokalisierungssignale und bewirken dadurch die Verschiebung des T-DNA-Komplexes in den Zellkern. Dort werden die schützenden Vir-Proteine abgebaut, die ssT-DNA wird zu einem Doppelstrang ergänzt und dann, vermutlich in einer koordinierten Aktion bakterieller und pflanzeigener Proteine, an zufälliger Stelle in eines der Chromosomen integriert. Die Expression der T-DNA-Gene bewirkt die Synthese von Opinen und Wachstumshormonen und die Tumorentwicklung.

tragung und Integration der T-DNA sind nur die beiden Randsequenzen notwendig. Sequenz und - in weiten Grenzen - Länge der zwischen diesen liegenden DNA spielen keine Rolle. 2. Die *vir*-Gene wirken auch in *trans*, d. h., T-DNA und *vir*-Region müssen nicht auf demselben Plasmid liegen. Diese beiden Beobachtungen ermöglichten die Konstruktion von Agrobakterienstämmen, die zwar beliebige Gene in Pflanzen übertragen können, aber keine Tumore mehr erzeugen. Die Ti-Plasmide der heute zur Transformation verwendeten Stämme haben eine voll funktionsfähige *vir*-Region, besitzen aber keine eigene T-DNA mehr (Abb. 10). Damit ist sichergestellt, dass aus den transformierten Pflanzenzellen normale fertile Pflanzen regeneriert werden können, welche die eingeführten Gene auf ihre Nachkommen übertragen. Die T-DNA mit den zu übertragenden Genen liegt auf einem zweiten Plasmid, dem Binärvektor (Abb. 11). Er hat zwei Replikationsursprünge, je einen für die Replikation in *Agrobacterium tumefaciens* und in *E. coli*. Er ist wesentlich kleiner als die Ti-Plasmide und deshalb bei den Klonierungsprozeduren leichter zu handhaben. Die Gene, welche man in die Pflanze übertragen möchte, werden zwischen die T-DNA-Randsequenzen in den Binärvektor eingesetzt und in *E. coli* kloniert. Die

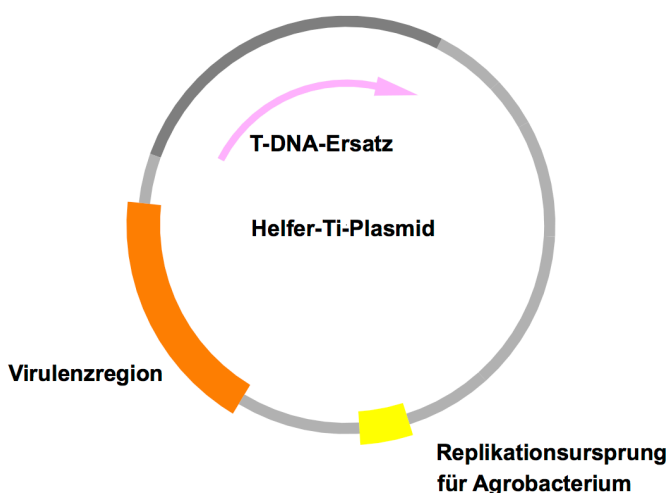


Abb. 10. Grundstruktur eines Helfer-Ti-Plasmids. Das Helferplasmid trägt eine vollständige *Vir*-Region. Seine T-DNA-Region ist durch funktionsneutrale Plasmid-DNA ersetzt. Auch die für die Opilverwertung und die bakterielle Konjugation zuständigen Gene fehlen.

Übertragung des Binärvektors nach *Agrobacterium* kann indirekt durch eine Dreielternkreuzung (triparental mating), eine Sonderform der bakteriellen Konjugation, erfolgen oder direkt durch Elektroporation und Inkubation der Agrobakterien mit der Vektor-DNA (Abb. 12).

Ursprünglich war die Agrolistik nur bei Pflanzen möglich, die zum natürlichen Wirtsbereich von *Agrobacterium tumefaciens* gehören. Dies sind viele zweikeimblättrige Pflanzen (Dikotylen), aber nur ganz wenige Einkeimblättrige (Monokotylen). Versuche, den Mais und andere Gräser agrolistisch zu transformieren, sind deshalb jahrelang erfolglos geblieben. Verschiedene Modifizierungen der Technik wie die Selektion und Weiterentwicklung hochvirulenter, entwaffneter Helferplasmide tragender Agrobakterienstämmen wie EH101 ([Hood u. a., 1986](#)), die Steigerung der Kopienzahl der Vektoren und andere Verbesserungen bewirkten aber, dass der Wirtsbereich der Wildbakterien wesentlich erweitert werden konnte. Auch die Länge der in Pflanzen übertragbaren T-DNA konnte vergrößert werden, so dass es möglich wurde, gleichzeitig mehrere Gene ins Pflanzengenom einzuführen. Zum Beispiel

tragen zur Modifizierung des Fettsäurestoffwechsels des mit dem Raps eng verwandten Braunen Senfs (*Brassica juncea*) entwickelte Binärvektoren eine T-DNA mit bis zu 9 hintereinander liegenden Enzymgenen, die in einem einzigen Transformationsschritt in den Senf übertragen werden können ([Wu u. a., 2005](#)). Heute lassen sich auch normalerweise unempfindliche Pflanzen wie Mais ([Ishida u. a., 1996](#)), Reis ([Hiei u. a., 1997](#)) und Weizen ([Shrawat & Lörz, 2006](#); [Tamás-Nyitrai u. a., 2012](#)) agrolistisch transformieren, ferner Pilze ([Abuodeh u. a., 2000](#)) und selbst menschliche Zellen ([Kunik u. a., 2001](#)). Diese Fortschritte nähren die Hoffnung, dass es gelingen kann, die meisten Kulturpflanzen mit *Agrobacterium* zu transformieren und die Agrolistik zu einem universellen Transformationssystem weiterzuentwickeln. Zunehmend konzentriert sich die Forschung dabei auf die Identifizierung der Wirtsmerkmale, welche die Transformierbarkeit bestimmen. Ansatzpunkte liefert die Analyse von transformationsresistenten und hypersensitiven *rat* (resistant to *Agrobacterium* transformation) und *hat* (hypersensitive to *Agrobacterium* transformation) -Mutanten bei *Arabidopsis*. Ihre Analyse zeigt, dass die Reaktion der Pflanze auf den Angriff des Bakteriums von weit mehr als 100 Genen beeinflusst wird, von denen vermutlich viele bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen ([Pačurar u. a., 2011](#)).

Der mit der Züchtung einer transgenen Pflanze verbundene Arbeitsaufwand hängt von der Wirksamkeit (Effizienz) des gesamten Transformations- und Regenerationsprozesses ab. Man gibt sie gewöhnlich in Prozent

an. Wenn ein agrolistisches Transformationsverfahren eine Effizienz von 1% besitzt, bedeutet dies, dass man im Mittel 100 Keimlinge oder Keimlingen entnommene Gewebestückchen (Explantate) in Gewebekultur nehmen und mit transformierten Agrobakterien behandeln muss, um eine transgene Pflanze zu erhalten. Die agrolistische Transformation von Raps lieferte bis vor wenigen Jahren Transformationseffizienzen von höchstens 4%, was

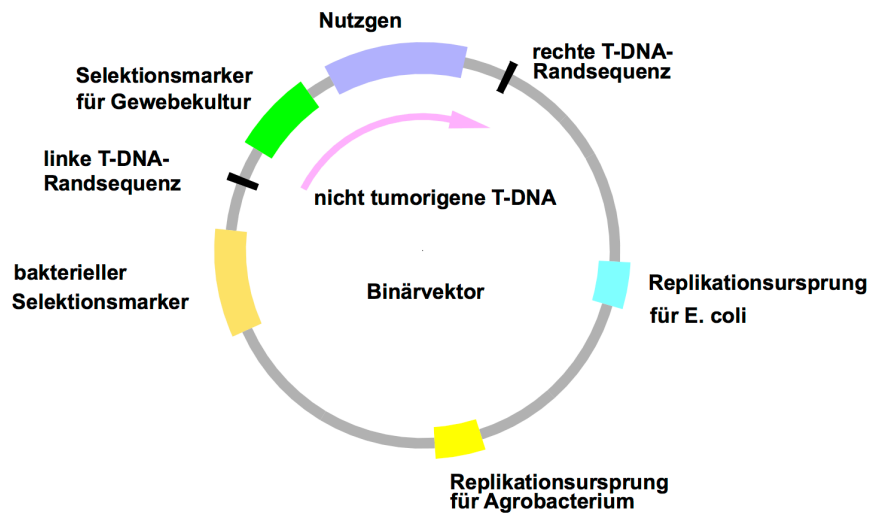


Abb. 11. Grundstruktur eines Binärvektors. Der Vektor trägt eine nicht tumorogene rekombinierte T-DNA, auf welcher mindestens ein Selektionsmarker für die Gewebekultur und eines oder auch mehrere Nutzgene liegen. Der außerhalb der T-DNA liegende bakterielle Selektionsmarker und die beiden Replikationsursprünge erlauben die Klonierung des Binärvektors sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium*. *Agrobacterium*-Stämme, welche ein Helferplasmid und einen Binärvektor besitzen, sind infektiös und übertragen die T-DNA des Binärvektors in die Pflanze. Dabei stellt das Helferplasmid die Vir-Funktionen.

damit zusammenhängt, dass in allen Phasen der Gewebekultur gewöhnlich mehr oder weniger große Verluste auftreten, die sich bisher nur dadurch in Grenzen halten lassen, dass man die Zusammensetzung der Kulturmedien, die Expositionszeiten der Explantate und andere wichtige Parameter der Gewebekultur in mühseliger und zeitraubender Arbeit optimiert. Inzwischen ist die agrolistische Transformation von Raps soweit verbessert worden, dass Transformationseffizienzen von 25% möglich sind. Die Regeneration kompletter Maispflanzen aus transformiertem undifferenziert wucherndem embryonalem Kallusgewebe, die ursprünglich die Kultivierung hunderter oder tausender kleiner Gewebeexplantate erforderte, viele Monate dauerte und nicht selten fehlschlug, gelingt dank wesentlich verbesserter Gewebekulturtechnik heute mit hoher Erfolgsrate in 6 - 8 Wochen ([Al-Abed u. a., 2006](#)). Unreife regenerationsfähige Maisembryo-

nen lassen sich mit modernen Protokollen mit einer Effizienz von 24% transformieren ([Hensel u. a., 2009](#)). Moderne Transformationsprotokolle haben den zusätzlichen Vorteil, dass der sonst häufig zu beobachtende unerwünschte Einbau mehrerer Kopien der T-DNA an verschiedenen Stellen des Genoms einer infizierten Pflanzenzelle weitgehend vermieden wird ([Cardoza & Stewart 2003](#)).

Die agrolistische Transformation ist heute die Methode der Wahl bei den meisten Pflanzenarten. Gewöhnlich werden intakte einzelne oder einige wenige direkt hintereinander liegende T-DNA-Kopien an einem oder 2 chromosomalen Loci stabil in AT-reiche Regionen des Nukleoms integriert, wobei es an der Insertionsstelle nur zu minimalen DNA-Umordnungen kommt. Gelegentlich ist die T-DNA am linken Ende verkürzt, und es wird etwas Vektor-DNA integriert. Die T-DNA wird nicht nur zur Einführung von Transgenen eingesetzt, sondern kann auch als Mutagen verwendet werden. Wenn transponierbare Elemente mit der T-DNA übertragen werden, wird die Mutationswirkung verstärkt. Man erhält so für die Identifizierung von Genen und ihren Funktionen wertvolle Mutantensammlungen.

Agrobacterium rhizogenes

Solange sich ein Transformationsprojekt noch in der Entwicklung befindet, lässt sich der mit der Regeneration verbundene Aufwand vermeiden, wenn man sich mit einem transienten Expressionssystem begnügt und die Transformation nicht mit *Agrobacterium tumefaciens* sondern mit der verwandten Art *Agrobacterium rhizogenes* durchführt. *Agrobacterium rhizogenes* (nach einer neueren Nomenklatur *Rhizobium rhizogenes*) ist ein gramnegatives Bodenbakterien, welches bei zweikeimblättrigen Pflanzen die Haarwurzelkrankheit auslöst. An der Infektionsstelle induziert es die Bildung zahlreicher vielfach verzweigter oft seitlich (plagiotrop) wachsender

Haarwurzeln. Das überentwickelte haarige Wurzelsystem und die Bildung runzeliger Blätter sind charakteristisch für den Phänotyp. Die Bakterien besitzen wurzelinduzierende (Ri, root inducing) Plasmide, die den Ti-Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens* entsprechen. Wie diese besitzen sie eine T-DNA, welche bei der Infektion in die Pflanzenzellen gelangt und ins Pflanzengenom eingebaut wird. Nach Integration und Expression der T-DNA-Gene des Ri-Plasmids entwickelt sich der haarwurzelige Phänotyp. Zur Transformation

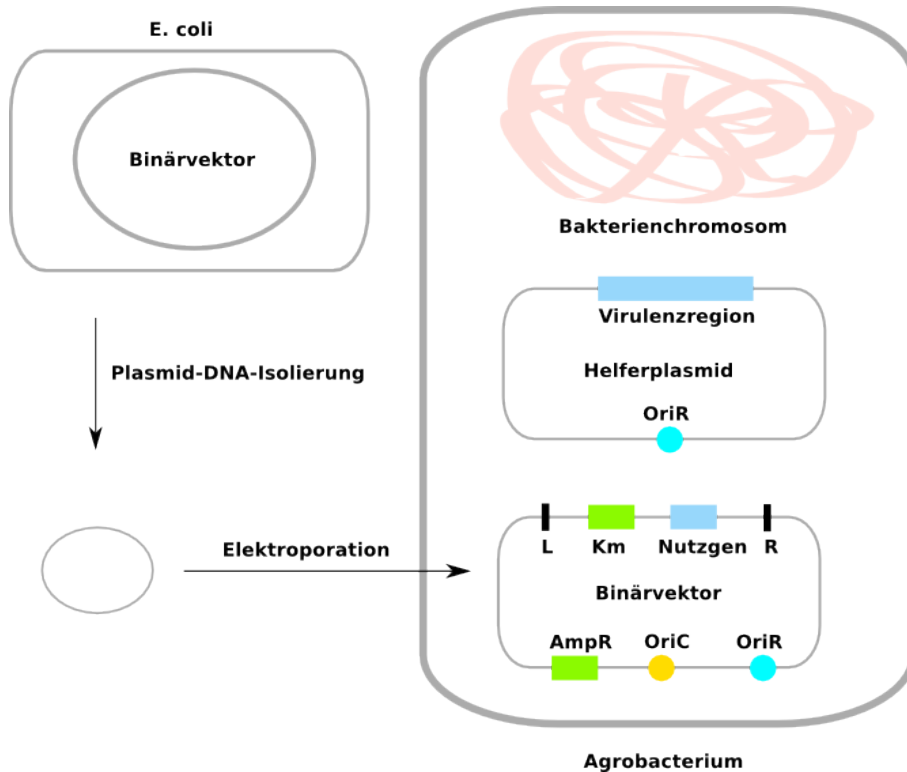


Abb. 12. Übertragung eines Binärvektors von *E. coli* nach *Agrobacterium tumefaciens* durch Elektroporation. Der Vektor wird in einem *E.-coli*-Stamm kloniert, aus dem dann die Vektor-DNA isoliert und mit einer Agrobaktériensuspension vermischt wird. Diese wird im Elektroporator kurzen Stromimpulsen ausgesetzt, welche die bakterielle Zellmembran vorübergehend für DNA-Moleküle durchlässig machen. Durch Aufnahme des Binärvektors werden die Agrobakterien, die ein Helfer-Ti-Plasmid mit einer intakten Vir-Region besitzen, transformationskompetent und können die T-DNA-Gene des Binärvektors in Wirtspflanzen übertragen. OriC Replikationsursprung für *E. coli*; OriR Replikationsursprung für *Agrobacterium*. L, R linke und rechte T-DNA-Grenzregion. Km Kanamycinresistenzgen, Selektionsmarker für die Gewebekultur. AmpR Ampicillinresistenzgen, bakterieller Selektionsmarker.

werden Keimlinge am Hypokotyl, der Übergangsstelle von Sprosssystem und Wurzelwerk zerschnitten. Anschließend wird der Spross an der Schnittstelle mit einer Agrobaktériensuspension behandelt und auf ein Kanamycin enthaltendes Selektionsmedium gesetzt. Die Agrobakterien infizieren nun das Wundgewebe und die wurzellosen Keimlinge bilden 8 - 10 Tage nach der Inokulation Adventivwurzeln, die kanamycinresistent sind. Die Wurzelbildungsrate beträgt bis zu 96%. Nicht transformierte Keimlinge sind kanamycinsensitiv und bilden keine Wurzeln. Die entstehenden Kompletzpflanzen sind Chimären. Das Wurzelwerk ist transformiert, die grünen Pflanzenteile nicht. Das System ist verwendet worden, um in der Zuckerrübe, bei der die Regeneration kompletter Pflanzen schwierig ist, eine PTGS-vermittelte (2.5) partielle Resistenz gegen das BNYVV-Virus (beet necrotic yellow vein virus) aufzubauen (Pavli u. a., 2010).

2.1.1.2 Biolistik

Die Biolistik ist die nach der Agrolistik verbreitetste Transformationsmethode. Ihr wichtigstes Einsatzgebiet ist die Transformation von Arten, welche der Infektion durch Agrobakterien widerstehen. Einer der ersten Erfolge der Partikelbeschusstechnik war

die Transformation einer Zellsuspensionskultur des Mais (Klein u. a., 1988; Gordon-Kamm u. a., 1990). Die Biolistik wird häufig zur Transformation von Getreide eingesetzt, wobei heute als Ausgangsmaterial meist unreife Embryoide verwendet werden. Beim biolistischen (biologisch-ballistischen) Transformationsverfahren, werden mikroskopisch kleine Gold- oder Wolframpartikel mit DNA beschichtet, in speziellen als "Genkanonen" bekannten Apparaturen explosionsartig beschleunigt und in Pflanzenzellen hineingeschossen. Die Mikroprojekteile haben einen Durchmesser von 1-3 µm und erreichen eine Geschwindigkeit von ca. 1500 km/h. Zur Beschichtung der Metallpartikel werden einige Milligramm davon in einer DNA-Lösung aufgeschwemmt, welche die zu übertragenden Gene enthält. Die Lösung wird mit Calciumchlorid und Spermidin versetzt. Durch das Calciumchlorid wird die DNA unlöslich, fällt aus und bleibt dabei an den Metallteilchen haften. Das Spermidin hilft bei der Fällung und stabilisiert zusätzlich die DNA. Die ersten Genkanonen (Abb. 13) waren

relativ einfach und bestanden im Wesentlichen aus einem metallischen Hohlzylinder, in dem ein Kolben gleiten konnte. Die DNA-beschichteten Mikroprojekte brachte man in einem Flüssigkeitstropfen auf die Stirnseite des Kolbens. Auf seiner Rückseite wurde eine Sprengladung gezündet, die das Projektil stark beschleunigte und auf eine Sperre prallen ließ. Die Metallpartikel werden durch die ruckartige Verzögerung abgerissen, fliegen durch ein Stahlsieb, wodurch der Partikelstrahl verbreitert wird und treffen dann auf das Zielgewebe. Moderne Genkanonen sind recht komplexe Apparaturen. Sie verwenden keinen Sprengstoff mehr, sondern arbeiten mit Heliumgasdruck. Die Beschleunigung entsteht durch eine Druckwelle, die man durch kurzzeitiges Öffnen eines Gasventils erzeugt. Neben stationären Geräten gibt es auch Handgeräte in Pistolenform. Bei diesen ist die Verwendbarkeit nicht durch die Größe der Beschusskammer begrenzt. Sie haben daher einen viel breiteren Einsatzbereich. Mit einer Genpistole kann man im Gewächshaus oder im Freiland arbeiten und komplette Pflanzen beschießen. Wenn es um Fragen geht, zu deren Beantwortung nicht alle Zellen einer Pflanze transformiert sein müssen, kann dies von Vorteil sein.

Im Zytoplasma der Zielzellen löst sich die DNA von den Metallpartikeln ab. Sie kann in den Zellkern gelangen und in die Chromosomen eingebaut werden. Die kinetische Energie der Mikroprojekte ist so hoch, dass sie

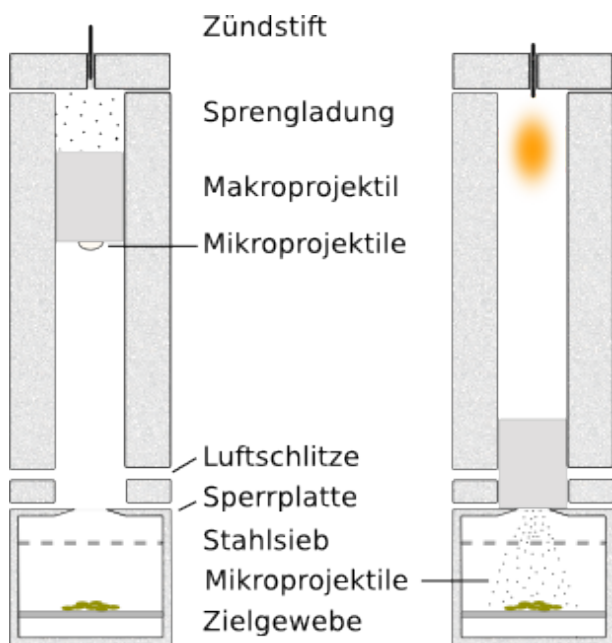


Abb. 13. Einfache Genkanone

mehrere Zellschichten durchdringen können. Dennoch werden bei einem Beschussexperiment nur wenige Zellen des beschossenen Gewebestückchens getroffen, und auch bei diesen kommt es nur in wenigen Fällen zu einem stabilen Einbau der neuen Gene ins Pflanzengenom. Um transgene Pflanzen zu erhalten, arbeitet man deshalb wie bei der Agrolistik mit Zell- oder Gewebekulturen, aus denen sich komplette Pflanzen entwickeln können. Da mit dem Nutzen ein Selektionsmarker, oft eine Kanamycin- oder Herbizidresistenz übertragen wird, können auf Nährböden, welche das Selektionsmittel enthalten, nur transformierte Zellen wachsen, und man erhält schließlich homogenes, von nicht transformierten Zellen freies Kallusgewebe für die nachfolgende Regeneration. Die Biolistik ist grundsätzlich bei allen gut regenerierenden Pflanzen anwendbar und eignet sich auch für zahlreiche andere biologische Systeme. Wegen der hohen Partikelgeschwindigkeit wird das Eindringen der Partikel in die Zielzellen nicht durch Zellwand- und Membranstrukturen verhindert. Neben DNA lässt sich auch RNA durch Partikelbeschuss übertragen. Mithilfe der Biolistik kann man Chloroplasten transformieren und Transplastomiker, Pflanzen mit normalem Nukleom (Kerngenom), aber

transgenem Plastom (Chloroplastengenom) regenerieren. Bisher ist die Biolistik praktisch das einzige zu diesem Zweck geeignete Verfahren. Neben diesen Vorzügen hat sie allerdings auch ihre Schwächen: Der apparative Aufwand ist hoch, und die Transformationsraten sind relativ niedrig. Ferner neigt der Partikelbeschuss stärker als die Agrolistik dazu, komplexe genomische Integrationsmuster zu generieren, bei denen an verschiedenen genetischen Loci teils intakte, teils verstümmelte Transgenkopien in die pflanzlichen Chromosomen eingebaut sein können. Der Einbau mehrerer Kopien eines Transgen ins Genom des Wirts ist ein Nachteil, weil dies gewöhnlich keine stärkere Expression, sondern die Stilllegung des Gens bewirkt. Fragmente von mehr als 10 kb Länge können biolistisch nicht wirksam übertragen werden. Sie haften schlecht an den Mikroprojekten oder werden beim Beschuss beschädigt, was zu unsauberen zur Züchtung marktfähiger Biotechpflanzen nicht verwertbaren Integrationsmustern führt.

2.1.1.3 Gewebekultur und Regeneration

Die agrolistischen und biolistischen Transformationsverfahren verwenden als Ausgangsmaterial gewöhnlich Gewebeexplantate, die auf selektiven, d. h. nur transformierten Zellen das Wachstum ermöglichenden Nährmedien kultiviert und zur Bildung von somatischen Embryonen (Embryogenese) oder von Sprossen oder Wurzeln (Organogenese) angeregt werden. Die Regenerationsfähigkeit pflanzlicher Gewebekulturen ist Voraussetzung für den Erhalt einer transformierten Pflanze. Beim Mais kann sie durch einfache Kreuzungen aus

einem gut regenerierenden Genotyp in einen nicht regenerierenden eingekreuzt werden, ist also genetisch bedingt ([Anami u. a., 2013](#)). Bei vielen Arten und Varietäten wird eine dauerhafte auf die Nachkommen übergehende Transformation bisher durch die fehlende Regenerationskapazität verhindert. Somatische Embryogenese und Organogenese beginnen gewöhnlich mit einer mehr oder weniger ausgedehnten Kallusphase. Ein Kallus ist ein Gewebe, das nach Verwundung aus bereits differenzierten Geweben und Organen entsteht. Es gibt zahlreiche verschiedene Kallustypen, von denen hier nur diejenigen Zellverbände wichtig sind, welche ohne geregelte Orientierung der Zellteilungsebene gebildet werden.

Durch Subkultur zerkleinerten Kallusgewebes lassen sich Suspensionskulturen, Mischungen aus kleineren Zellaggregaten und Einzelzellen, und Einzelzellkulturen gewinnen, aus welchen wieder Kalluskulturen angezogen werden können. Der gesamte Regenerationsprozeß (Abb. 14) gliedert sich in mehrere Phasen: Kallusinduktion, Kultivierung des induzierten Kallus, Regeneration von Organen (Sprosse, Wurzeln) oder Embryonen und schließlich von Pflanzen.

Kallusinduktion

Die Induktion des Kalluswachstums ist an beliebigen Pflanzenorganen möglich. Wenn die Pflanzen, denen das Ausgangsgewebe entnommen wird, nicht mehr jung genug sind, wird die Kallusinduktion erschwert. Bei unter nichtsterilen Bedingungen gewachsenen Pflanzen kann das Ausgangsmaterial Bakterien enthalten, die durch Oberflächensterilisation nicht zu eliminieren sind. Wenn möglich, geht man deshalb von Keimlingen oder jungen Pflanzen aus, die unter sterilen Bedingungen aus Samen aufgezogen wurden. Die Explantate werden zur Kallusinduktion auf Agarmedium ausgelegt, das neben Mineralsalzen organische Zusätze, insbesondere Wachstumshormone enthält. Außer chemisch definierten Medien verwendet man auch solche mit komplexen Zusätzen wie Kokosnussmilch. Welche Phytohormone und Konzentrationen benötigt werden, hängt vom Gewebetyp, der Pflanzenart und dem Entwicklungszustand der Pflanze ab und muss ausprobiert werden.

Kalluskultur

Hat sich am Explantat Kallus gebildet, muss er subkultiviert werden, bis genügend Kallusmaterial zur Verfügung steht und der Kallus keine Reste des ursprünglichen Explantats mehr enthält. Zur Unterhaltung des Kalluswachstums verwendet man Medien mit bestimmten Konzentrationen und Mengenverhältnissen an Wachstumshormonen (Auxinen und Cytokininen). Kultiviert wird anfangs im Schwachlicht oder bei Dunkelheit. Mit Einleitung der Organogenese muss man belichten, um ein Ausbleichen (Etiement) zu verhindern. Je nach Art der Kulturbedingungen wächst der Kallus nicht nur mehr oder weniger rasch, sondern sieht auch ganz verschieden aus. So kann er locker oder fest gefügt sein und Differenzierungen aufweisen. Ältere Kalli sind oft morphologisch und genetisch heterogen. Häufig finden sich in ihnen verholzte Zellen oder Elemente des Leitungssystems. Durch Produktion sekundärer Pflanzenstoffe kommt es zu unterschiedlichen Färbungen. Hält man den Kallus in völliger Dunkelheit, wuchert er in weißlicher oder gelblicher Farbe. Belichtet man, bildet er Chlorophylle aus. Bräunliches Aussehen, das auf eine Oxidation von phenolischen Inhaltsstoffen zurückgeht, ist ein Indiz dafür, dass es höchste Zeit für eine neue Subkultur ist; denn gebräunte Zellen stehen meist vor dem Absterben oder sind schon tot. Zur Subkultur wird der Kallus je nach seiner Größe in mehr oder weniger zahlreiche Teilstücke zerlegt, die auf frisches Medium überführt werden. Nicht selten kommt es im Kallus zu Mutationen. Man spricht von somaklonaler Variation. Manche herbizidresistenten Biotechpflanzen haben ihren Ursprung in solchen genetischen Veränderungen während der Kallusphase der Regeneration. Um die somaklonale Variation einzuschränken, sollte die Gewebekulturphase so kurz wie möglich gehalten und Gewebekulturstress möglichst vermieden werden, was sich bis zu einem gewissen Grade durch niedere Lichtintensitäten, minimale Konzentrationen von Hormonen und Selektionsmitteln und Zugabe von Antioxidantien und organischen Puffersubstanzen zum Medium erreichen lässt.

Organogenese

Als Organogenese bezeichnet man die Entstehung von Sprossen oder Wurzeln aus undifferenzierten Kalluszellen. Die Hauptregulatoren der Organogenese sind zwei Gruppen von Wachstumshormonen, Auxine und Cytokinine. Die Sprossregeneration erfordert eine zweistufige Hormonbehandlung. Ein hohes Auxin/Cytokininverhältnis im Kulturmedium induziert am Explantat die Bildung von organogenem Kallus, und anschließend induziert ein hohes Cytokinin/Auxinverhältnis die Sprossbildung. Die gebildeten Sprosse können bewurzelt werden, wenn sie auf ein Medium umgesetzt werden, welches entweder hormonfrei ist oder das Hormon Isobuttersäure enthält, welche die Wurzelbildung fördert. Organogene zur Sprossbildung fähige Kalluskulturen kennt man von vielen Pflanzenarten, wobei als Ausgangsmaterial neben Gewebeexplantaten auch

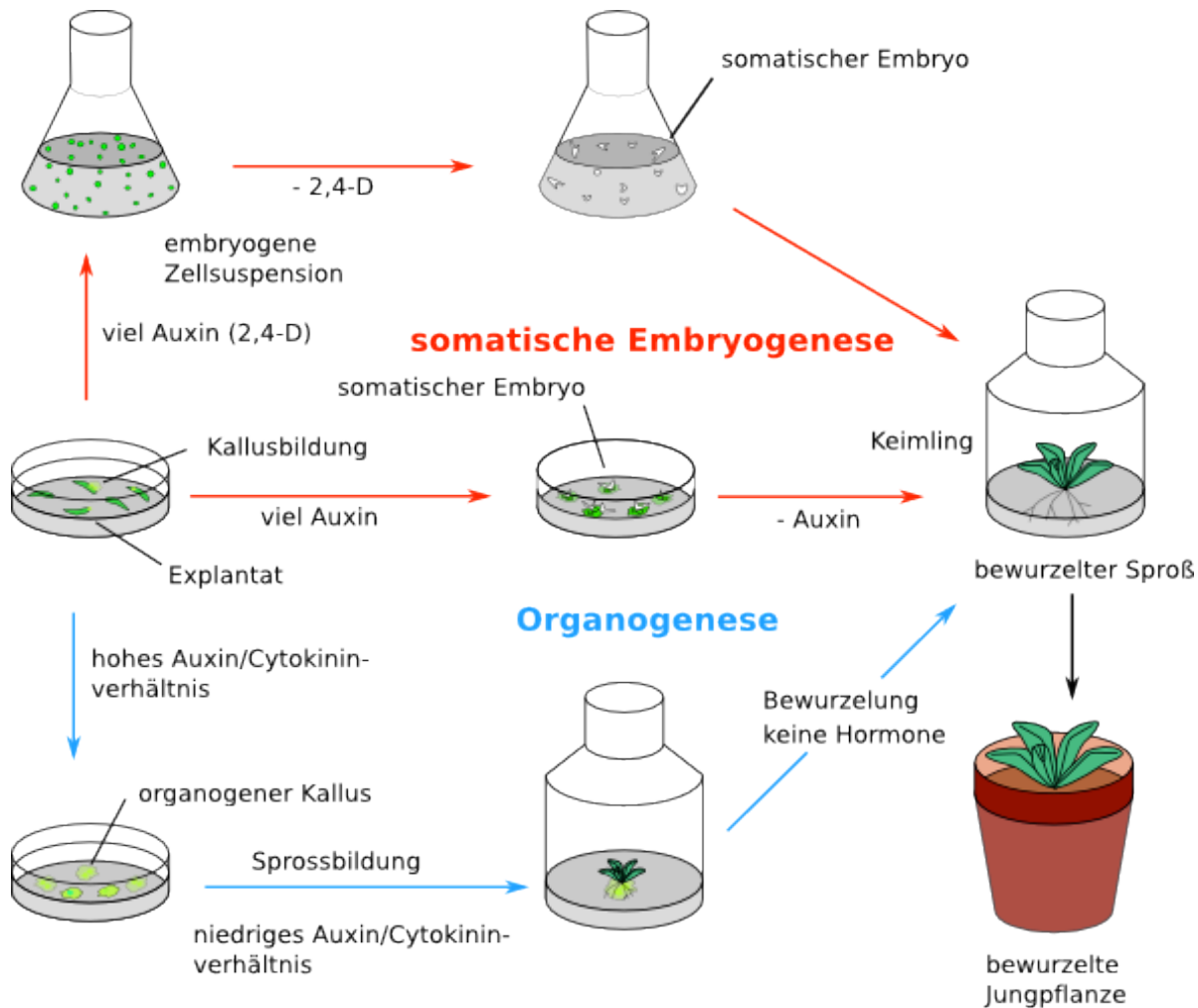


Abb. 14. Entwicklungsprozesse zur Regeneration von Pflanzen aus Zell- und Gewebekulturen. Das Ausgangsmaterial bilden kallusbildende auf festen Nährmedien kultivierte Gewebeexplantate.

Embryogenese: Zerkleinertes in flüssigen Nährmedien angezogenes Kallusgewebe liefert eine aus Mikrokalli und isolierten Zellen bestehende Suspensionskultur, in welcher eine kleine Subpopulation der Zellen die Kompetenz zur Bildung von Embryoiden erwirbt. Der Kompetenzerwerb benötigt hohe Auxinkonzentrationen. Das synthetische Auxin 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) ist besonders wirksam. Nach Absetzung des Hormons beginnen die Embryoide zu somatischen Embryonen auszuwachsen und können auf festes Medium übertragen werden, wo sie sich zu bewurzelten Keimlingen entwickeln. Bei Anwendung hoher Auxinkonzentrationen kann auch am Explantat gebildeter oder subkultivierter Kallus Embryoide bilden, welche nach Absetzung der Hormone bewurzelte Keimlinge liefern.

Organogenese: Wenn die Explantate in Gegenwart einer Mischung aus Auxinen und Cytokinen kultiviert werden, entwickelt sich organogener Kallus, an dem sich nach Überführung auf ein Medium mit veränderten Hormonkonzentrationen wahlweise entweder Wurzeln oder Sprosse induzieren lassen. Dabei fördert ein niedriges Auxin/Cytokinin-Verhältnis die Sprossbildung, ein hohes die Bewurzelung. Im letzten Schritt der Regenerationsprozesse werden die bewurzelten Keimlinge in Erde übertragen ([Anami u. a., 2013](#)).

Zell- und Protoplastenkulturen verwendet werden. Auch sind mehrere genetische Regelkreise bekannt, die an Dedifferenzierung, Entstehung neuer Bildungsgewebe (Meristeme) und Redifferenzierung beteiligt sind. Das Transkriptionsprofil von organogenem Kallus ähnelt demjenigen von Seitenwurzeln, was andeutet, dass die Sprossregeneration mit einem wurzeltypischen Entwicklungsweg beginnt. Seitenwurzeln entwickeln sich aus

dem Perizykel, einer peripheren Zellschicht des Zentralzylinders der Primärwurzel. Diese Zellen können als Meristemzellen betrachtet werden, welche sich bei richtiger hormoneller Stimulierung in organogene zur Sproßbildung fähige Kalluszellen verwandeln können.

Bei der 1985 von [Horsch u. a.](#) eingeführten Blattscheibentechnik (Leaf-Disk-Technik) werden Blattscheiben ausgestanzt, mit Agrobakterien inkubiert und auf Agar ausgelegt. Im Agarmedium sind Hormone zur Sproßbildung enthalten. Nach einigen Tagen werden die Bakterien größtenteils durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Explantate werden auf frisches Sprossinduktionsmedium gesetzt, welches zusätzlich Antibiotika enthält, welche die Agrobakterien am Wachstum hindern. Wenn Kanamycin als Selektionsmarker verwendet wird, wird auch dieses Antibiotikum zugesetzt. Es hindert nicht transformierte Pflanzenzellen am Wachstum, während transformierte Zellen, welche die Kanamycinresistenz exprimieren, nicht beeinträchtigt werden. Es bildet sich dann an den Wundrändern kanamycinresistenter Kallus und nach einiger Zeit entwickeln sich kanamycinresistente transgene Sprosse, die auf ein neues Medium übertragen und dort bewurzelt werden können. Bei Tabak, Petunie und Tomate, die alle zu den Nachtschattengewächsen gehören, konnten mit der Blattscheibentechnik bald nach ihrer Einführung transgene Pflanzen erhalten werden. Sie ist ein vor allem bei Modellpflanzen beliebtes, weil einfaches, agrolistisches Transformationsverfahren geworden. Die Explantate stammen inzwischen aus den verschiedensten Pflanzenteilen. Bei vielen anderen Arten ist aber eine Regeneration aus Explantaten bisher nicht möglich.

Somatische Embryogenese

Somatische Embryonen oder Embryoide entwickeln sich in einer Gewebekultur aus undifferenzierten Zellen. Sie können nicht nur an Kallus gebildet werden, sondern auch in Suspensions- oder Einzelzellkulturen. Embryoide ähneln stark zygotischen Embryonen, die im Fruchtknoten der Blüte nach der Bestäubung gebildet werden und von mütterlichem Gewebe umschlossen sind. Viele acker- und gartenbaulich wichtige Arten, auch Getreidearten, werden heute durch somatische Embryogenese aus der Gewebekultur regeneriert. Man braucht hohe Konzentrationen von Wachstumshormonen wie Auxin, 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) oder Dicamba (3,6-Dichlor-2-methoxy-Benzoesäure), um in einer kleinen Subpopulation der kultivierten Zellen den Übergang vom vegetativen Wachstum zur Embryoidbildung einzuleiten. Der somatische Embryo ist eine bipolare Struktur, welche ein Sprossapikalmeristem und eine Keimwurzel (Radicula) besitzt, im Gegensatz zu dem monopolen, wurzellosen Spross, welcher bei der Organogenese gebildet wird. Der somatische Embryo durchläuft alle von der zygotischen Embryogenese bekannten Entwicklungsstadien, und sein Genexpressionsprogramm ist mit dem der zygotischen Embryogenese vergleichbar. Der Embryo entsteht aus einer einzelnen Zelle und hat keine Gefäßverbindung mit dem mütterlichen Kallusgewebe oder dem kultivierten Gewebeexplantat. Embryoide sind deshalb klonal. Durch Organogenese regenerierte Sprosse entstehen gewöhnlich aus mehreren Einzelzellen. Sie sind dann chimär und bestehen nach der Transformation aus einer Mischung unabhängig voneinander transformierter Zellen. Die Bildung von Embryoiden ist erstmals 1958 an Gewebekulturen der Karotte beobachtet worden und lieferte einen frühen Beleg für die Totipotenz pflanzlicher Zellen.

2.1.1.4 Selektionsmarker

Selektionsmarker verwendet man, um bei einem Transformationsexperiment nicht transformierte Zellen am Wachstum zu hindern und um Gegenwart und Expression der übertragenen Gene in den Nachkommen der primären Transformanten überwachen zu können. Bei jedem Transformationsexperiment wird nur ein sehr kleiner Teil der behandelten Zellen transformiert. Ohne Selektionssystem ist deshalb die Wahrscheinlichkeit, transformierte Zelllinien zu erhalten gering. Meistens benutzt man Selektionsmarker, welche Resistenz gegen Antibiotika wie Kanamycin, Neomycin, Hygromycin oder Herbizide wie Phosphinothricin verleihen. Auch Stoffwechselgene, welche die Verwertung bestimmter von Pflanzen im allgemeinen nicht genutzter organischer Verbindungen wie Mannose als C-Quelle ermöglichen, lassen sich als Selektionsmarker einsetzen. Selektionsmarkergene verknüpft man mit starken Promotern, welche die konstitutive Expression in der ganzen Pflanze sicherstellen.

Neomycinphosphotransferase

Neomycinphosphotransferase II, auch Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase II, ist ein Enzym des Transposons Tn5 von *E. coli*. Es vermittelt seinen Wirtszellen Resistenz gegen Kanamycin, Neomycin und zahlreiche weitere Aminoglykosidantibiotika. Das Enzym katalysiert die Phosphorylierung der 3'-Hydroxylgruppe des Aminozuckeranteils dieser Glykoside, wodurch diese Antibiotika entgiftet werden. NPTII exprimierende transgene Pflanzen können bestimmte Konzentrationen dieser Antibiotika ertragen, während nicht exprimierende Pflanzen

ausbleichen und zugrundegehen. Das NPTII-Gen ist der in der Pflanzengentechnik verbreitetste Selektionsmarker. Für seine Expression in Pflanzen wird das NPTII-Gen oft mit der Promoter- und Terminatorregion des Nopalinsynthasegens der T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* verknüpft, lässt sich jedoch auch mit anderen Expressionssignalen wie dem CaMV35S-Promoter kombinieren. Resistente transformierte Pflanzen lassen sich identifizieren, indem man Samen primärer Transformanten auf kanamycinhaltigen Medien keimen lässt oder auch durch direkten Nachweis des NPTII-Proteins oder seiner Aktivität mit immunologischen oder enzymatischen Methoden.

Hygromycinphosphotransferase

Hygromycinphosphotransferase ist das Proteinprodukt des *hpt*-Gens, auch *aph-IV*-Gens, von *E. coli*. Hygromycin B hemmt die Proteinsynthese bei vielen Pflanzen, anderen Eukaryonten und Prokaryonten. Hygromycinphosphotransferase inaktiviert das Antibiotikum. Es ist für Pflanzen giftiger als Kanamycin und wird besonders dann verwendet, wenn Kanamycin nicht wirkt.

Phosphinothricin-N-Acetyltransferase

Phosphinothricin (Ammoniumglufosinat) ist der Wirkstoff von Basta und verschiedenen anderen Herbiziden (Rely®, Finale®, Liberty®), die weltweit eingesetzt werden. Es ist ein Bruchstück des Tripeptids L-Phosphinothricyl-L-alanyl-L-Alanin, welches erstmals aus den Bodenbakterien *Streptomyces viridochromogenes* und *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde. Glufosinat ist ein Strukturanalogon der Glutaminsäure und hemmt das pflanzliche Enzym Glutaminsynthase, ein Schlüsselenzym des Aminosäurestoffwechsels, welches das in der Zelle mit Ammoniumionen im Gleichgewicht stehende Ammoniak in die Aminosäure Glutamin einbaut. Die Folge ist ein rascher Anstieg der Konzentration von Ammoniumionen und die Erschöpfung des Vorrats an Glutamin und mehreren anderen Aminosäuren in der Pflanze. Die Pflanzen bleichen aus, stellen die CO₂-Fixierung ein und welken innerhalb von Stunden. Das *bar*-Gen von *Streptomyces hygroscopicus* und das *pat*-Gen von *Streptomyces viridochromogenes* kodieren beide das Enzym Phosphinothricinacetyltransferase (PAT). PAT verwandelt L-Phosphinothricin durch Acetylierung in das ungiftige N-Acetyl-L-Phosphinothricin. Nicht nur die beiden Bakterien, sondern auch das freie Enzym kommen natürlicherweise im Boden vor.

Acetolactatsynthase

Acetolactatsynthase (ALS), auch Acetohydroxysäuresynthase (AHAS) katalysiert den ersten Schritt der Biosynthese verzweigter Aminosäuren in Pflanzen. Imidazolinon- und Sulfonylharnstoffherbizide hemmen das Enzym. Bei Sonnenblume, Weizen, Reis, Raps und Mais hat man durch chemische Mutagenese Mutanten erzeugen können, welche gegen Imidazolinonherbizide wie Imazethapyr, Imazamox u. a. unempfindlich sind. Mehrere wurden seit 1992 kommerzialisiert. Zur Erzeugung der Toleranz kann eine einzelne Punktmutation im ALS-Gen genügen, so dass man die Toleranz in vielen Kulturpflanzen erzeugen kann ([Tan u. a., 2005](#)). Bei einer Reihe von Pflanzen sind natürliche Mutationen im ALS-Gen bekannt, welche Herbizidresistenz bewirken. Bei Reis, Mais und Weizen sind natürliche oder durch chemische Mutagenese erzeugte ALS-Mutanten als Selektionsmarker genutzt worden. Da sie in allen Pflanzen vorkommen und ihre Nutzung die Verwendung von Antibiotikaresistenzen vermeidet, gewinnen ALS-Mutationen als Selektionsmarker zunehmend an Bedeutung.

Phosphomannoseisomerase

Das *omi*-Gen von *E. coli* kodiert das Enzym Phosphomannoseisomerase (PMI), welche die reversible Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Fructose-6-Phosphat katalysiert. Obwohl Phosphomannoseisomerase in der Natur weit verbreitet ist, fehlt sie den meisten Pflanzen mit Ausnahme der Sojabohne und anderer Leguminosen. Pflanzen, welche das Enzym nicht bilden, können Mannose-6-Phosphat im Gegensatz zu Fructose-6-Phosphat nicht als Kohlenstoffquelle verwerten. In nicht transgenen Pflanzen hemmt sich anhäufendes Mannose-6-Phosphat die Glykolyse, was zum Ende von Wachstum und Entwicklung führt. Transgene PMI bildende Pflanzen wandeln Mannose-6-Phosphat in Fructose-6-Phosphat um und überleben so auf Nährböden welche ausschließlich Mannose-6-Phosphat als C-Quelle enthalten. Als Selektionsmarker ist PMI ziemlich wirksam. Bei der Zuckerrübe konnte damit die Transformationseffizienz auf das 10fache gesteigert werden ([Joersbo u. a., 1998](#)).

2.1.1.5 Reportergene

Reportergene kodieren Proteine, welche bereits unmittelbar nach einem Transformationsexperiment in transformiertem Kallusgewebe direkt nachgewiesen werden können. Sie werden besonders zur Messung von Promoteraktivitäten eingesetzt, zur Sichtbarmachung der intrazellulären Lokalisierung von Transproteinen oder

zur Analyse ihrer Wechselwirkungen mit Pflanzenproteinen. In diesen Fällen genügt eine transiente Genexpression. Die am häufigsten verwendeten Reporter sind β -Glucuronidase, Luziferase, das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) und Anthocyanidin.

Grün Fluoreszierendes Protein

Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein aus der Qualle *Aequorea victoria* stammendes im blauen oder ultravioletten Licht fluoreszierendes Photoprotein. Die Sequenz des nativen Gens ist im Hinblick auf die Expression in Pflanzen optimiert worden, was eine stärkere Expression, bessere Thermostabilität und höhere Fluoreszenzintensität bewirkt. Gleichzeitig vermeidet man bei der Expression des nativen Gens in Pflanzen beobachtete Aberrationen wie fehlerhaftes Spleißen und Bildung nicht funktioneller oder toxischer Proteinaggregate. Der GFP-Test ist nicht destruktiv und benötigt keine exogenen Zusatzfaktoren. Das Proteinmolekül ist relativ klein und in Pflanzen recht stabil. Das GFP-Gen kann leicht mit Pflanzengenen verknüpft werden, wodurch man Fusionsproteine erhält, deren subzelluläre Lokalisierung sich im Fluoreszenzmikroskop *in vivo* sichtbar machen lässt. Durch Substitution einzelner Aminosäuren der GFP-Sequenz sind mehrere GFP-Varianten entwickelt worden, bei denen die Fluoreszenz in den blauen, gelben oder roten Bereich verschoben ist. EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) ist eine viel genutzte Variante mit gesteigerter Fluoreszenzintensität.

β -Glucuronidase

β -Glucuronidase ist ein vom *uidA* (*gusA*)-Gen von *E. coli* kodiertes Enzym. Es kommt in Mikroorganismen, Wirbellosen und Wirbeltieren vor, nicht aber bei den meisten Pflanzen. β -Glucuronidase katalysiert die Hydrolyse von Glukuroniden wie 5-Brom-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc), eine farblose Verbindung, welche durch β -Glucuronidase in einen blauen unlöslichen Indigofarbstoff umgewandelt wird. Sie ermöglicht die histochemische Lokalisierung von β -Glucuronidase in mit dem *uidA*-Gen transformierten Zellen und Geweben. Empfindlicher als der Farbttest ist ein fluorimetrischer Test, bei dem Methylumbelliferylglucuronid als Substrat verwendet wird. Dieses wird von β -Glucuronidase in eine blau fluoreszierende Verbindung umgewandelt. Der Test eignet sich zur Messung von Promoteraktivitäten, ist aber im Gegensatz zum GFP-Test destruktiv. GUS ist in Pflanzen stabil und auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch.

Luziferase

Das Luziferasereportergen stammt aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* und kodiert Luziferase, welche die ATP-abhängige mit der Aussendung von Lichtquanten verbundene oxidative Dekarboxylierung von Luziferin katalysiert. Die in der Zeiteinheit ausgesandte Lichtmenge ist der Luziferaseaktivität proportional und kann mit empfindlichen Kameras quantitativ verfolgt werden. Der Test ist nicht destruktiv, hochempfindlich und liefert die Ergebnisse innerhalb von Minuten. Es sind lösliche Luziferinformen entwickelt worden, welche in lebende Zellen eindringen können. Der Luziferintest ermöglicht so die Verfolgung von Reporteraktivitäten in lebenden Geweben und ganzen Pflanzen.

2.1.1.6 Promotertypen

Ein Promoter ist ein am Anfang eines Gens liegender DNA-Abschnitt, welcher das quantitative und qualitative Expressionsprofil des nachgeschalteten Gens definiert. Man kennt starke, schwache, konstitutive, gewebespezifische, entwicklungsregulierte und induzierbare Promoter. Für die Expression von Transgenen in Pflanzen verwendete Promoter können sowohl aus dem Genom der Zielpflanze als auch aus anderen Pflanzen stammen. Nicht aus Pflanzen stammende Promoter werden jedoch vom pflanzlichen Transkriptionssystem gewöhnlich nicht erkannt und sind deshalb in Pflanzen inaktiv. Promoter sind modular aufgebaut. Sie enthalten kurze Signalsequenzen, welche Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, spezifischer regulatorischer Proteine, sind und für bestimmte Promotereigenschaften wie die Gewebespezifität oder die Induzierbarkeit durch Licht oder andere Außenwirkungen verantwortlich sind. Die modularen Signalsequenzen sind oft in verschiedenen Pflanzenarten funktionsfähig und können neu kombiniert werden. Damit lassen sich synthetische Promoter mit verändertem Expressionsverhalten konstruieren, womit die Möglichkeiten der gentechnischen Pflanzenzüchtung deutlich erweitert werden.

Konstitutive Promoter

Konstitutive Promoter bewirken die Expression des zugehörigen Gens in nahezu allen Zelltypen und Entwicklungsphasen. CaMV35S, der Promoter des 35S-Transkripts des Blumenkohlmosaikvirus (cauliflower mosaic virus) ist besonders gut charakterisiert. Er ist in vielen ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen aktiv und

wird in allen Pflanzengewebe stark exprimiert, mit Ausnahme von Pollen. Neben dem CaMV35S-Promoter wird ein verwandter viraler Promoter, der Figwort-Mosaic-Virus-35S-Promoter (FMV35S) eingesetzt. Ein anderer starker konstitutiver Promoter, der vor allem bei der Transformation von Getreide benutzt wird, ist der Promoter eines Ubiquitins des Mais (*ubi1*). Ubiquitin ist ein in allen eukaryontischen Zellen vorkommendes (ubiquitäres) Protein. Es verändert Eigenschaften wie Halbwertszeit, Funktion oder intrazelluläre Verteilung anderer Proteine, an die es reversibel gebunden wird. Zellphysiologische Prozesse, an denen das Ubiquitinsystem mitwirkt, sind Proteinqualitätskontrolle, Signalübertragung und Zellzyklus. Es sind noch weitere starke konstitutive Promoter bekannt, die sich zur Konstruktion von Expressionskassetten für Pflanzen verwenden lassen.

Orts- und phasenspezifische Promoter

Sie werden dann eingesetzt, wenn ein Transgen nur in bestimmten Geweben, Organen oder Entwicklungsphasen einer Pflanze aktiv werden soll. Enzyme, welche die Qualität von Samenölen oder -proteinen verbessern können, werden nur im Samen gebraucht. Indem man ihre Gene mit samenspezifischen Promotern koppelt, lässt sich erreichen, dass sie nur im Samen während der Samenentwicklung gebildet werden. Ta29 ist ein Promoter, der nur im Tapetum, der Innenwand der Pollensäcke, aktiv wird. Er ist mit einem Gen verknüpft, welches eine RNase (Barnase) kodiert und in den Raps eingeführt wurde. Rapspflanzen, welche die Barnase im Tapetum exprimieren, können keinen fertilen Pollen bilden und sind männlich steril. Sie ermöglichten die Entwicklung des Barnase/Barstar Sterilitätssystems, mit dem sich die Hybridenzüchtung beim Raps wesentlich vereinfachen lässt. Es sind heute sehr viele gewebe- und phasenspezifische Promotersequenzen bekannt und charakterisiert. Sie bilden ein reiches Reservoir bei der Entwicklung von Nutzpflanzen mit höherem Ertrag und besserer Erntequalität.

Induzierbare Promoter

Viele Pflanzengene werden von induzierbaren Promotern gesteuert. Sie sind nur aktiv, wenn oder solange die Pflanze ein Außensignal wahrnimmt, welches den Promoter aktiviert. Zu den am besten untersuchten induzierbaren Promotern gehören diejenigen lichtregulierter Gene. Das Ergrünen im Dunkeln gewachsener junger Keimlinge im Licht beginnt mit der Lichtaktivierung von Genen, welche die Synthese von Chlorophyllen und anderen Blattpigmenten ermöglichen. Neben physikalischen Reizen wie Licht, Hitze oder Kälte können auch chemische Verbindungen Promoteraktivitäten auslösen, auch Substanzen, die nicht natürlicherweise in der Pflanze vorkommen wie Tetrazyklin, Steroide, Ethanol, Herbizide oder Kupferionen. Der Anwendungsschwerpunkt induzierbarer Promoter liegt bisher überwiegend in der Grundlagenforschung. Zu den bereits realisierten biotechnischen Anwendungen gehören ein tetrazyklininduzierbares System zur Produktion pharmazeutischer Proteine in pflanzlichen Zellkulturen und der Einsatz eines ethanolinduzierbaren Systems zur Produktion von Proteinen in Pflanzen. Für landwirtschaftliche Anwendungen sind chemische Induktoren dann besonders interessant, wenn sie im Produktionsmaßstab angewandt werden können, dabei Umwelt und Gesundheit nicht beeinträchtigen und den Ertrag nicht negativ beeinflussen. Substanzen, die alle diese Forderungen befriedigend erfüllen, kennt man bisher kaum.

2.1.1.7 Gateway-Vektoren

Viele moderne Binärvektoren haben einen Umfang von 10 - 13 kb. Sie sind damit 15 - 20mal kleiner als die Ti-Plasmide, aber immer noch groß verglichen mit den vielen nur ca. 2,5 kb großen Standardvektoren für *E. coli*. Große Plasmide haben viele Restriktionsschnittstellen, wovon die meisten mehrmals vorhanden sind. Sowohl die Vektorkonstruktion als auch der gesamte Klonierungsprozess wird dadurch wesentlich erschwert.

Einfache Binärvektoren tragen innerhalb der T-DNA-Region eine auf dem Vektor nur einmal vorhandene (singuläre) Restriktionsschnittstelle. Sie wird benutzt, um die ringförmige Vektor-DNA mit der passenden Restriktionsendonuklease aufzuschneiden. Das linearisierte Vektorplasmid kann nun mithilfe von DNA-Ligase mit einer pflanzlichen Expressionskassette verknüpft und dann wieder zu einem Ring geschlossen werden. Die Expressionskassette enthält neben einem Selektionsmarker eines oder auch mehrere Funktionsgene, die für den gewünschten Phänotyp verantwortlich sind. Jedes Gen besteht aus einem Promoter, der kodierenden Sequenz und einer Terminatorregion. Alle diese Elemente müssen in einer Serie von DNA-Restriktions- und Ligationsreaktionen *in vitro* zusammengebaut und in *E. coli* zwischengeklont werden, was die gesamte Vektorkonstruktion umständlich und zeitraubend macht. Während die meisten Binärvektoren in den 90er Jahren noch mithilfe von Restriktionsenzymen und Ligasen konstruiert wurden, verwendet man heute mehr und mehr

die moderne Gateway-Technik. Sie kommt ohne diese Enzyme aus, ist hocheffizient und verwendet eine einheitliche Arbeitsvorschrift, welche für viele Vektortypen geeignet ist.

Gateway-Vektoren (Gattervektoren) sind weiterentwickelte T-DNA-Vektoren, welche diese mühsamen Klonierungsprozeduren größtenteils entbehrlich machen. Sie erlauben den schnellen und einfachen Austausch von DNA-Elementen zwischen verschiedenen Vektorgrundgerüsten. Das interessierende DNA-Fragment wird zunächst in einem Gateway-Eingangssvektor (entry vector) kloniert und kann von diesem in eine Vielzahl von Gateway-Destinationsvektoren (destination vectors) übertragen werden, welche bereits für spezielle Anwendungen wie Transgenexpression, Genstilllegung oder Promoteranalyse vorkonstruiert worden sind. Basis der Gateway-Technik ist das sequenzspezifische DNA-Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ (lambda, Abb. 15).

Das λ -Rekombinationssystem

Bakteriophagen (griechisch: „Bakterienfresser“) sind Viren, die Bakterien befallen. Im Kopf des einer Injektionsspritze ähnelnden Phagenpartikels befindet sich ein lineares Doppelstrang-DNA-Molekül, welches der Phage nach Adsorption an eine Wirtszelle ins Zellplasma injiziert. Die Aktivierung der Phagengene bewirkt eine Umsteuerung des Stoffwechsels der Bakterienzelle, die nun vorrangig die Phagen-DNA repliziert und neue Phagenpartikel produziert. Schließlich geht das Bakterium zugrunde, seine Zellwand löst sich auf, und die Tochterphagen werden frei. Nicht immer löst das Eindringen eines Phagenoms in eine Wirtszelle den lytischen (Lyse: Auflösung) Vermehrungszyklus aus. Mit geringer Wahrscheinlichkeit kann die Phagen-DNA

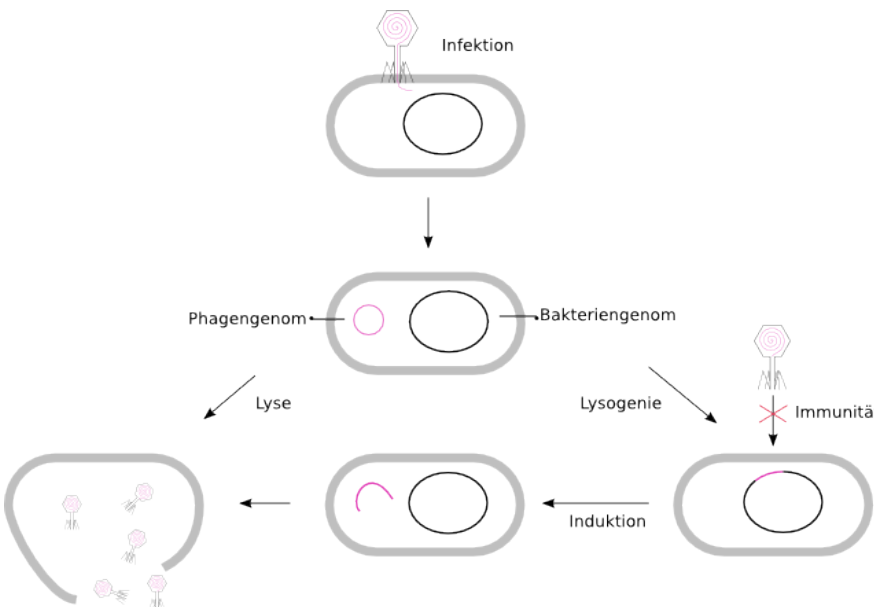


Abb. 15. Vermehrungszyklen lysogener Bakteriophagen. Nach der Adsorption an die Außenwand einer Bakterienzelle injiziert der Phage sein Genom, einen linearen DNA-Doppelstrang in die Bakterienzelle, wo es zu einem Ring geschlossen wird. Lytischer Zyklus: Das Phagenom wird transkribiert, vervielfältigt und das Bakterium bildet Phagenproteine. Phagen-DNA und -proteine werden zu Phagenpartikeln assembliert, das Bakterium löst sich auf und setzt die Tochterphagen frei. Lysogenie: Die Phagen-DNA wird in einem ortsspezifischen Rekombinationsprozess an definierter Stelle ins Bakteriengenom eingebaut und bei der Teilung der Bakterienzelle an deren Nachkommen weitergegeben. Durch die Integration wird der Phage zum lysogenen Prophagen. Gleichzeitig wird das Bakterium immun gegen eine nochmalige Infektion mit dem gleichen Phagentyp. Der lysogene Zustand bleibt erhalten, bis er durch Stressfaktoren wie UV-Bestrahlung beendet wird. Der Prophage wird dann aus dem Bakterienchromosom ausgeschnitten, und der lytische Zyklus beginnt.

nach der Infektion ins Genom der Wirtszelle eingebaut werden, wodurch der Phage in den lysogenen Zustand übergeht. So kann er als Prophage über viele Bakteriengenerationen vererbt werden, bis der lysogene Zustand durch UV-Bestrahlung oder andere Stressfaktoren beendet wird. Die Phagen-DNA wird dann aus dem Bakterienchromosom ausgeschnitten, und der lytische Vermehrungszyklus beginnt.

Die Integration des Phagenoms findet an speziellen Anheftungsstellen des bakteriellen und des Phagenoms statt, die als *att- λ* (*att*: attachment) bezeichnet werden (Abb. 16). Die Sequenz der bakteriellen Anheftungsstelle heißt *attB* und besteht aus den drei Segmenten B-O-B'. Die komplementäre Sequenz im ringförmigen Phagenom heißt *attP* und besteht aus den Segmenten P-O-P'. Die Integration selbst benötigt das Phagenenzym *Int* (Integrase) und das Bakterienprotein *IHF* (integration host factor). Beide Proteine binden *attP* und bilden einen DNA-Proteinkomplex, welcher der ortsspezifischen Rekombination zwischen Phagen- und Bakteriengenom dient. Die ursprüngliche B-O-B'-Sequenz wird durch die Integration zu *attL*-Phagen-DNA-*attR*. *attL* hat die

Struktur B-O-P', *attR* die Struktur P-O-P'. Die Phagen-DNA ist jetzt Teil des Bakteriengenoms. Die Integration ist reversibel; die Exzision benötigt aber ein weiteres Phagenenzym, die Exzisionase Xis. Ihr Gen *xis* wird aktiv, wenn der Prophage induziert und der lysogene Zustand aufgehoben wird. Welche Reaktion bevorzugt wird, hängt vom Konzentrationsverhältnis der beiden Rekombinasen Int und Xis ab. Ist die Konzentration von Xis niedrig und die von Int hoch, wird die Phagen-DNA integriert. Sind beide Enzymkonzentration annähernd gleich und hoch, wird die Phagen-DNA ausgeschnitten. Dabei wird die ursprüngliche Sequenz der *attB*- und *attP*-Anheftungsstellen wiederhergestellt.

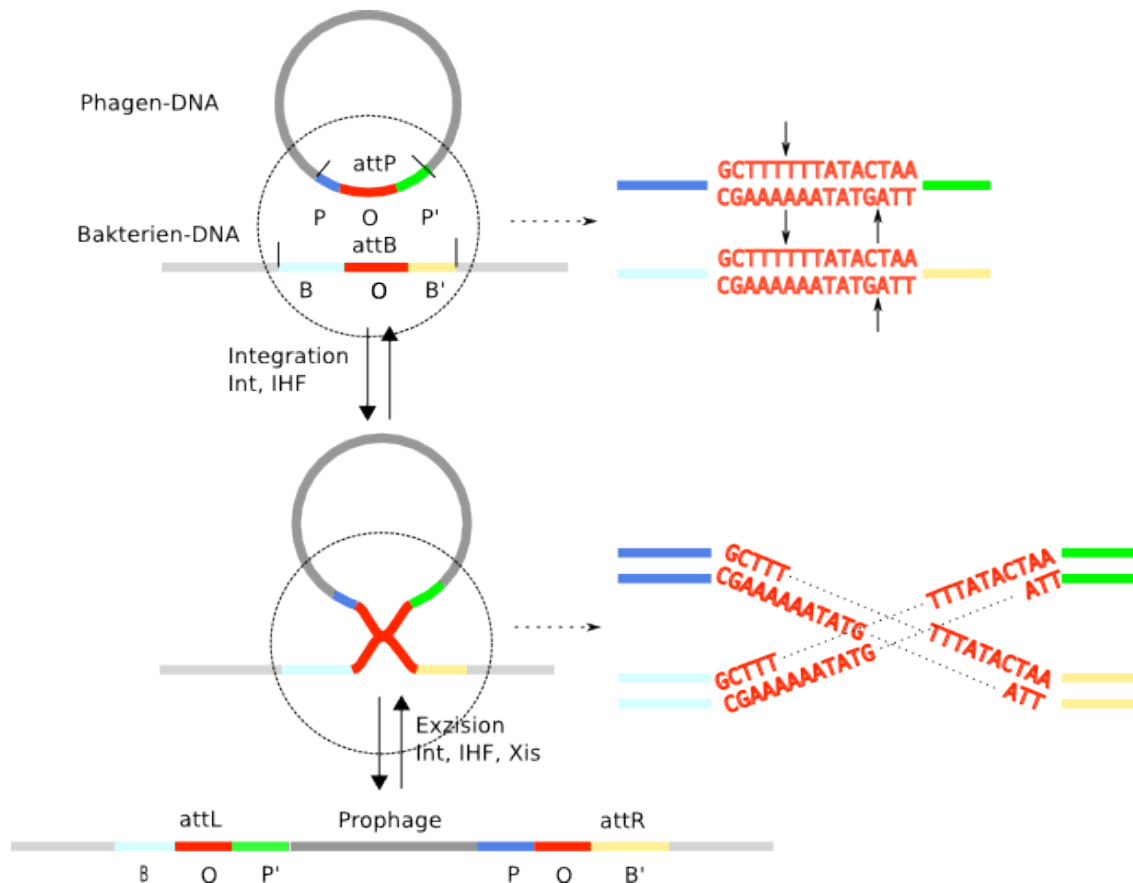


Abb. 16. Integration und Exzision des Phagenenoms finden an zwei definierten Anheftungsstellen (attachment sites) des bakteriellen bzw. Phagenenoms statt, welche eine gemeinsame 15 bp lange Kernsequenz O besitzen. Die Anheftungsstelle des Phagenenoms (*attP*) besteht aus 3 Segmenten POP', die des Bakteriengenoms (*attB*) aus den 3 Segmenten BOB'. Die Sequenzen der Sequenzarme P, P', B, B' sind alle verschieden. Die Rekombination findet innerhalb der Kernsequenz statt. Dabei werden die Arme neu kombiniert, und der Prophage ist nach der Integration von 2 neuen *att*-Sequenzen *attL*, *attR* eingeschlossen. Die Reaktion ist umkehrbar und kann *in vitro* durchgeführt werden. Welche Richtung bevorzugt wird, hängt vom Konzentrationsverhältnis der beteiligten Proteine ab. Die Integration benötigt das Phagenprotein Int und das Bakterienprotein IHF (integration host factor). Die Exzision benötigt zusätzlich das Phagenprotein Xis. Es ermöglicht die Exzision und hemmt die Integration. Die *att*-Sequenzen werden bei der Rekombination von den Rekombinationsproteinen gebunden. Diese bilden das Intasom, einen Molekülkomplex, auf dessen Oberfläche die *att*-Sequenzen parallel zueinander ausgerichtet werden. In jeder der beiden Kernsequenzen werden zwei um 7 bp versetzte Einzelstrangsnitte gesetzt. Anschließend werden die losen Enden kompatibler Einzelstränge kreuzweise miteinander verknüpft. Bisher ist der Rekombinationsmechanismus nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt.

Eingangsvektoren

Die Gateway-Technik benutzt die *att*-Stellen und die Rekombinationsenzyme zur DNA-Rekombination *in vitro*. Die Integrationsreaktion heißt im Gatewaysystem BP-Reaktion. Sie benötigt die Phagenintegrase Int und den Wirtsfaktor (IHF). Die Mischung der beiden Proteine heißt BP-Klonase. Die Exzisionsreaktion bezeichnet man als LR-Reaktion. Sie benötigt zusätzlich die Exzisionase Xis. Die Mischung von Int, IHF und Xis heißt im Gatewaysystem LR-Klonase. Die Kernsequenzen zweier Anheftungsstellen müssen nicht mit der ursprünglichen λ -Kernsequenz übereinstimmen, damit sie *in vitro* miteinander rekombinieren können. Sie müssen aber identisch sein, da die versetzten Einzelstrangsnitte, mit denen die paarenden DNA-Doppelstränge aufgetrennt werden, sonst keine kohäsiven Einzelstrangenden liefern. Das Gateway-Grundsystem verwendet 4 Paar modifizierter *att*-Sequenzen (*attB1*, *attP1*), (*attB2*, *attP2*), (*attL1*, *attR1*), (*attL2*, *attR2*). Nur die Sequenzen desselben Paares können miteinander rekombinieren. Im ersten Schritt der Gateway-Klonierung (Abb. 17) werden die nicht miteinander paarenden *att*-Sequenzen *attB1* und *attB2* an das Zielgen angefügt. Gewöhnlich platziert man *attB1* an den Anfang und *attB2* ans Ende des Zielgens. Am elegantesten erreicht man das mit der Polymerasekettenreaktion (PCR). Das PCR-Produkt hat die Struktur *attB1*-Zielgen-*attB2*. Es wird im nächsten Schritt einer BP-Reaktion mit einem Eingangsvektor unterworfen, der eine *attP1*-*ccdB*-*attP2*-Kassette besitzt. Durch die BP-Klonase wird das Zielgen in den Eingangsvektor eingebaut. Da *attB1* nur *attP1* und *attB2* nur mit *attP2* paaren kann, ist die Orientierung des Zielgens im Vektor festgelegt und bleibt bei allen Klonierungsschritten erhalten. Seine Genkassette hat nun die Struktur *attL1*-Zielgen-*attL2*. Da die Rekombination nicht quantitativ verläuft, liefert die BP-Reaktion eine Mischung, die neben dem rekombinierten auch den unveränderten Eingangsvektor enthält. Mit dieser Mischung transformiert man nun einen *E.-coli*-Stamm und plattiert die Bakterien auf ein kanamycinhaltiges Agarmedium. Das Antibiotikum verhindert das Wachstum nicht transformierter Bakterien. Bakterien, welche den unveränderten Eingangsvektor aufgenommen haben, sind zwar kanamycinresistent, tragen aber den *CcdB*-Marker. *CcdB* ist ein bakterielles Proteintoxin, welches die bakterielle DNA-Gyrase hemmt und dadurch die DNA-Replikation beeinträchtigt. *CcdB* ist ein positiver Selektionsmarker. Zellen, welche das Gen exprimieren, wachsen nicht, es sei denn, sie besitzen die Fähigkeit, die Gyrasefunktion zu neutralisieren. Dies trifft nur auf spezielle *E.-coli*-Stämme zu, welche man verwendet um *ccdB*-Vektoren zu erhalten. Auf dem kanamycinhaltigen Medium wachsen somit nur Bakterien mit dem rekombinierten Eingangsvektor. Damit hat man jetzt einen Eingangsklon, aus dem man den rekombinierten Eingangsvektor in beliebiger Menge isolieren kann. Aus diesem kann man nun das Zielgen in einer LR-Reaktion in einen binären Destinationsvektor übertragen, welcher eine *attR1*-*ccdB*-*attR2*-Kassette und eine weitere Antibiotikaresistenz, z. B. für Spectinomycin, besitzt. Bei der LR-Rekombination (Abb. 18) werden die *att*-Sequenzen des Eintrittsvektors wiederhergestellt, und der rekombinierte Binärvektor hat die Struktur *attB1*-Zielgen-*attB2*. Mit der LR-Mischung transformiert man nun wieder einen *E.-coli*-Stamm und bringt die Bakterien auf spectinomycinhaltiges Medium. Dabei wachsen nur Zellen, welche den rekombinierten Binärvektor aufgenommen haben. Damit hat man einen Klon für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*.

Destinationsvektoren

Ein Destinationsvektor (destination vector) ist ein binärer Gateway-Vektor für spezielle Anwendungen wie die Expression eines Reportergens, einer Herbizidresistenz oder einer kleinen Interferenz-RNA (small interfering RNA, si-RNA, RNAi) für die posttranskriptionelle Genstilllegung. Es sind bereits zahlreiche Gateway-kompatible binäre Vektorreihen für die Transformation von Pflanzen entwickelt worden, die sich im wesentlichen nur durch Art und Anordnung der Bauteile ihrer Expressionskassetten unterscheiden. ([Karimi u. a., 2002, 2013](#); [Tanaka u. a., 2012](#)). Unter anderem gibt es spezielle Gattervektoren zur Analyse des Wurzelstoffwechsels mithilfe der RNAi-vermittelten Genstilllegung ([Muranaka, 2011](#)). Ein für RNAi-Analysen bestimmter Destinationsvektor hat die allgemeine Kassettenstruktur

Promoter-*attR1*-*ccdB*-*attR2*-Linker-*attR2*-*ccdB*-*attR1*-Terminator.

Durch eine LR-Reaktion mit einem *attL1*-Trigger-*attL2*-Eingangsklon wird die Triggersequenz in beide *att*-Stellen in invertierter Orientierung eingebaut, was ein

Promoter-*attB1*-Trigger-*attB2*-linker-*attB2*-Triggerkomplement-*attB1*-Terminator-

Konstrukt liefert. Die Triggersequenz ist eine Subsequenz des stillzulegenden Gens. Wenn sie in Pflanzen einge-

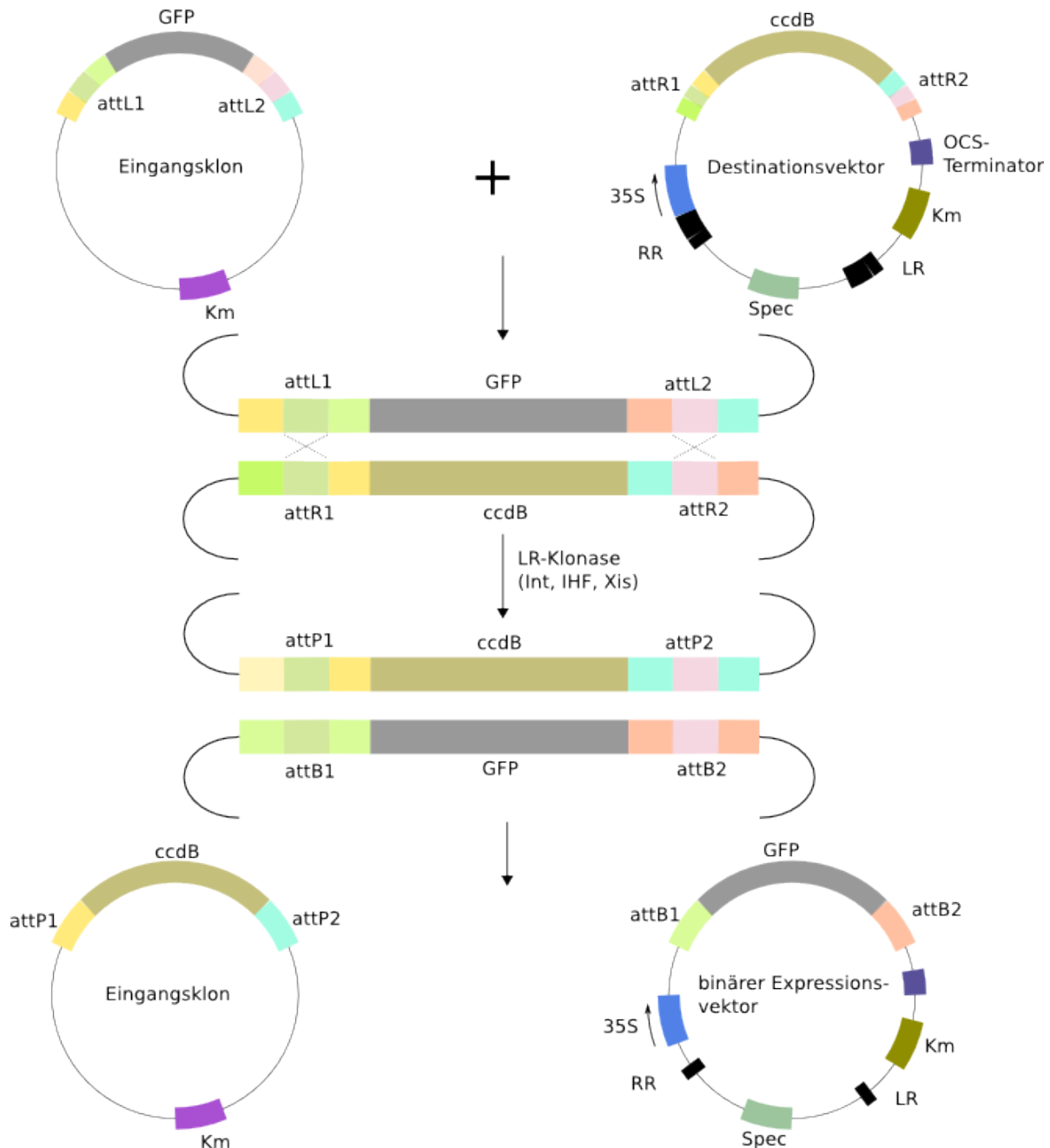


Abb. 17. Konstruktion eines binären GFP-Expressionsvektors mit der Gatewaytechnik 1: Konstruktion des Eingangsklons. Eine cDNA des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) wird mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) und zwei Adapterprimern vervielfältigt, die am 5'-Ende jeweils eine attB-Sequenz tragen. Im ersten PCR-Zyklus werden die att-Sequenzen an die Enden der GFP-cDNA angefügt. PCR-Produkt, Eingangsvektor und BP-Klonase werden gemischt, kompatible att-Stellen paaren miteinander, und die BP-Klonase katalysiert ein doppeltes Rekombinationsereignis, welches das ccdB-Gen des Vektors mit der GFP-cDNA vertauscht. Da die Rekombination innerhalb der Kernsequenzen stattfindet, vertauscht sie auch die Innenarme der Anheftungsstellen. Dadurch entsteht an jeder Rekombinationsstelle ein Paar neuer miteinander kompatibler att-Sequenzen. Das lineare Nebenprodukt attL1-ccdB-attL2 wird zur Konstruktion des Expressionsvektors (Abb. 18) nicht mehr gebraucht.

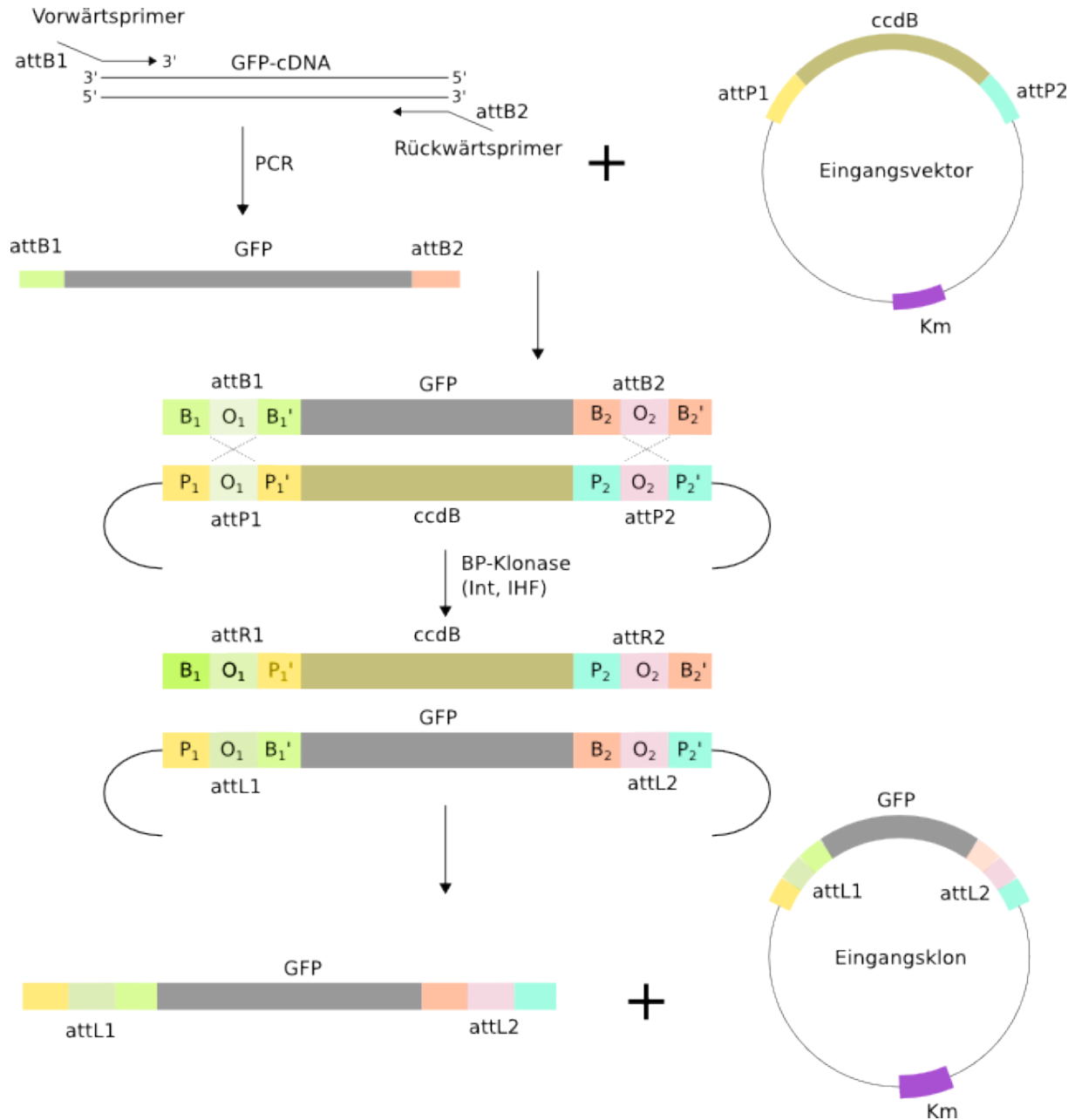


Abb. 18. Konstruktion eines binären GFP-Expressionsvektors mit der Gatewaytechnik 2: Übertragung des GFP-Gens vom Eingangsklon in den Destinationsvektor. In einer Mischung aus Eingangsklon, Destinationsvektor und LR-Klonase katalysieren Int, IHF und Xis den Segmentaustausch zwischen den att-Stellen. Dabei werden die ursprünglichen Anheftungsstellen (attP1, attP2), (attB1, attB2) wiederhergestellt. Der Expressionsvektor, der jetzt das GFP-Gen mit vorgeschaltetem CaMV35S-Promoter trägt, lässt sich in *E. coli*-Zellen auf Spec-Platten beliebig vermehren. Die Spectinomycinresistenz verhindert dabei die Vermehrung nicht transformierter Bakterien, und das ccdB-Gen verhindert die Vermehrung sowohl des Eingangsklons als auch des nicht rekombinierten Destinationsvektors. Transgene Pflanzen, die mit dem Expressionsvektor agrolistisch transformiert wurden, exprimieren GFP unter Kontrolle des CaMV35S-Promoters in allen Pflanzenteilen. 35S CaMV35S-Promoter, OCS Oktopinsynthasegen der T-DNA, Km-Kanamycinresistenz, LR linker T-DNA-Rand, RR rechter T-DNA-Rand, Spec Spectinomycinresistenz. Die Spectinomycinresistenz liegt außerhalb der T-DNA. Letztere ist in Wirklichkeit viel kürzer als der Rest des Vektorplasmids.

führt wird, wird eine RNA mit einer Haarnadelstruktur exprimiert und zu kleinen einzelsträngigen RNAi-Molekülen verarbeitet, welche mit komplementären Abschnitten der RNA des Zielgens kurze Doppelstrangbereiche bilden können. Die RNA des Zielgens wird so für den Abbau markiert und dann durch den PTGS-Mechanismus (2.5) abgebaut.

Das Gateway-Klonierungssystem ist ursprünglich von [Hartley u. a. \(2000\)](#) entwickelt worden und wird von der Firma Invitrogen vertrieben. Die modifizierten λ -att-Sequenzen sind patentiert. Gegenüber der klassischen Klonierungstechnik mit Restriktionsenzymen und Ligasen bietet es mehrere wesentliche Vorteile: Das Zielgen wird stets in definierter Orientierung in den Destinationsvektor eingebaut. Seine von einem Pflanzenpromoter innerhalb der T-DNA des Destinationsvektors ausgehende Transkription in der Zielpflanze liefert damit stets die richtige RNA-Sequenz. Die Rekombinationsreaktionen sind rastertreu und bewirken keine Sequenzveränderungen. Somit lassen sich mit geeigneten Destinationsvektoren leicht N- und C-terminale Genfusionen herstellen, wobei ein Teil der kodierenden Sequenz des Fusionsgens vom Eingangsvektor, der andere vom Destinationsvektor stammt. Die ganze Gateway-Prozedur benötigt verglichen mit den klassischen Methoden sehr viel weniger Zeit. Ihr größter Nachteil liegt darin, dass man an die Klonierungstechnik eines bestimmten Herstellers gebunden ist

2.1.1.8 Plastidentransformation

Chloroplasten

Blätter und andere grüne Pflanzenteile verdanken ihre Farbe den Chloroplasten (Abb. 19). Das sind grüne, linsenförmige Körperchen mit einer komplexen Innenstruktur und 4 - 10 μm \varnothing , die zu mehreren bis sehr vielen in der Zelle liegen und große Mengen an Chlorophyll und anderen Blattfarbstoffen enthalten. Durch die Photosynthese wandeln die Chloroplasten Licht in chemische Energie um und legen damit die energetische Basis für fast alle anderen Lebensformen. In den Chloroplasten wird Kohlenstoff, Wasserstoff und Phosphor assimiliert. Nitrat und Sulfat werden reduziert, und aus dem Wasser wird Sauerstoff freigesetzt. Der Sauerstoff der Erdatmosphäre stammt überwiegend aus der in den Chloroplasten ablaufenden Photosynthese. Wegen ihrer überragenden ökologischen Bedeutung sind die Chloroplasten seit gut 100 Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Nach außen sind die Chloroplasten von einer aus einer Lipidgrundschrift aufgebauten Doppelmembran umgeben. In diese sind zahlreiche Proteinkomplexe (Translokatoren) eingelagert, die den Stoffaustausch mit dem Zellplasma kontrollieren. Im Innern der Chloroplasten liegen zahlreiche plattenförmige,

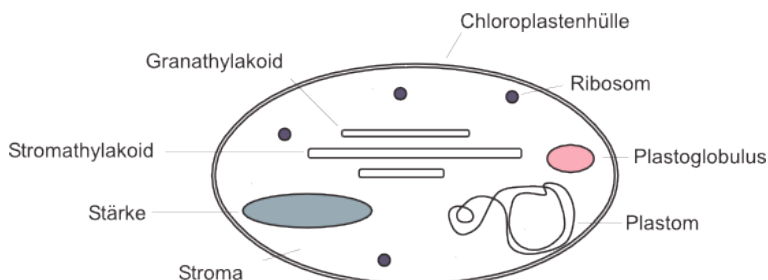


Abb. 19. Einfaches Chloroplastenmodell. Die Chloroplasten der Landpflanzen sind linsenförmige bis ca. 10 μm große von einer Doppelmembran umschlossene Körperchen. Das Chloroplastengenom (Plastom, ptDNA) ist ein nackter, nicht von Proteinen bedeckter, ca. 130 kbp großer ringförmiger DNA-Doppelstrang. Die Lichtreaktionen der Photosynthese laufen in der Membran der Thylakoide ab, die Dunkelreaktionen in der Grundmasse, dem Stroma. Die Thylakoide sind abgeflachte, von einer einfachen Membran umschlossene Säckchen, welche als größere Stromathylakoide das Innere durchqueren oder als kleinere Granathylakoide zu Stapeln, den Grana, aufgeschichtet sind. Photosyntheseprodukte werden in Form von Stärkekörnern und als Lipidspeicher dienenden Plastoglobuli abgelegt. Chloroplasten besitzen eigene Ribosomen und einen kompletten dem der Bakterien ähnlichen Proteinsyntheseapparat.

in sich geschlossene Membrankörper, die Thylakoide. Die Thylakoidmembran enthält Chlorophylle und Carotinoide, die an Proteine gebunden sind. An diesen Molekülkomplexen finden die Lichtreaktionen der Photosynthese statt.

Plastiden

Nicht grüne Pflanzengewebe sind chloroplastenfrei, können aber mit den Chloroplasten verwandte Zellorganellen enthalten. Diese werden mit den Chloroplasten unter dem Oberbegriff Plastiden zusammengefasst. Farblose photosynthetisch inaktive Plastiden (Leukoplasten) kommen in Wurzeln, im Innern von Sprossen und in vielen Blütenblättern vor. Oft sind sie auf die Speicherung von Reservestoffen spezialisiert. Durch Carotinoide gelb gefärbt sind die im Herbstlaub zu findenden Altersformen der Chloroplasten (Gerontoplasten). Von ihnen sind die Chromoplasten zu unterscheiden, die ebenfalls Carotinoide enthalten und deshalb gelb, orange oder rot gefärbt sind, aber in Blüten, Früchten und in der Karottenwurzel gefunden

werden. Im Laufe der Embryonal- und Organentwicklung gehen die Plastiden aus viel kleineren, noch undifferenzierten Vorformen, den Proplastiden hervor. Mit Ausnahme der Gerontoplasten behalten sie auch im entwickelten Zustand ihre Teilungsfähigkeit und sind ineinander umwandelbar.

Plastom

Seit Beginn des vergangenen Jahrhunderts kennt man bei Pflanzen rein mütterlich vererbte Merkmale, die wie die Plastiden nicht durch den Pollen, sondern nur durch die Eizellen weitergegeben werden. Schon früh wurde deshalb vermutet, dass die Plastiden eine eigene Erbinformation, das Plastom, enthalten. Um 1960 wurde die DNA der Chloroplasten elektronenmikroskopisch nachgewiesen und isoliert. Heute sind zahlreiche Plastome vollständig sequenziert. Die Chloroplasten-DNA (ptDNA, Abb. 20) ist ein ca. 130 - 160 kbp großer nackter, d. h. nicht mit Proteinen assoziierter, ringförmiger Doppelstrang mit einem Umfang von ca. 45 µm und einer Kodierkapazität von rund 100 Proteinen. Dies reicht nicht, um alle plastidenspezifischen Proteine zu kodieren. Man schätzt, dass ca. 1 Drittel bis maximal die Hälfte der Chloroplastenproteine plastomkodiert sind. Die Gene der restlichen Proteine befinden sich im Zellkern. Viele Multienzymkomplexe der Chloroplasten sind aus plastom- und kernkodierten Proteinen zusammengesetzt. Chloroplasten sind polyploid. Sie enthalten 40 bis über 100 Kopien der Plastiden-DNA. Vor der Teilung einer Plastide werden die DNA-Ringe ähnlich wie ein Bakterienchromosom repliziert und dann nach dem Zufallsprinzip auf die beiden Tochterplastiden verteilt. Plastiden und ebenso Mitochondrien haben nicht nur ihre eigene DNA sondern auch einen eigenständigen, dem der Prokaryonten (Bakterien) ähnlichen Proteinsyntheseapparat, mit dem sie die vom Plastom bzw. Mitochondriengenom (Chondrom) kodierten Gene in Proteine übersetzen können. Diese sind für die Zelle lebenswichtig, da Mitochondrien und Chloroplasten die Funktionsträger der Zellatmung bzw. der Photosynthese sind. Verfahren zur Transformation der Mitochondrien gibt es bisher nicht. Dagegen gelang die Transformation des Plastoms bereits vor mehr als 20 Jahren ([Svab u. a., 1990](#)).

Plastomtransformation

Die Transformation des Plastoms liefert transplastomische Pflanzen (Transplastomiker). Gegenüber der Transformation des Nukleoms hat sie potentielle Vorteile: 1. Da die Chloroplasten bei der Mehrzahl der Blütenpflanzen mütterlich vererbt werden, können Transgene kaum durch Pollenflug auf andere Pflanzen übertragen werden. Die Übertragung von Plastiden durch Pollen ist äußerst selten. Gleiches gilt für den Übergang von Plastidengenen in den Zellkern ([Day u. a., 2011](#)). 2. Fortgeschrittene Varianten der Plastomtransformation erlauben die Entwicklung von Biotechpflanzen, die keine Antibiotikaresistenzgene oder andere Selektionsmarker mehr enthalten ([Klaus u. a. 2004](#)). 3. Da grüne Pflanzenzellen gewöhnlich viele Chloroplasten enthalten, bekommt man eine wesentlich höhere Genexpression als bei der Transformation des Nukleoms. Rekombinierte Plastidenproteine können bis zu 70% des Blattproteins ausmachen. 4. Transgene werden durch homologe oder ortsspezifische Rekombination an definierten Regionen des Plastoms eingebaut, wodurch die Inaktivierung von Wirtsgenen vermieden wird. 5. In den Chloroplasten liegen zentrale Stoffwechselwege, deren Modifizierung theoretisch Pflanzen mit überlegenen agronomischen Eigenschaften liefern kann. Als prinzipieller Nachteil der Plastomtransformation ist zu werten, dass sie nur bei Genen nützlich ist, deren Produkte in grünen Pflanzenteilen gebildet werden. Die Zusammensetzung in Samen oder Wurzeln gebildeter Speicherstoffe lässt sich so nicht verändern. Allerdings können plastomkodierte Gene nicht nur in den Chloroplasten sondern auch in Chromoplasten und Leukoplasten exprimiert werden. Insofern ist es denkbar, dass der Stoffwechsel pflanzlicher Speichergewebe, welche Chromoplasten (Karottenwurzel) oder Leukoplasten (Kartoffelknolle, Endosperm vieler Samen) führen, durch Transformation des Plastoms beeinflusst werden kann.

Methodisch gesehen ist die Transformation des Plastoms weitaus schwieriger als die des Nukleoms. Die *input*-DNA muss die doppelte Chloroplastenhülle durchqueren. Als Genübertragungsverfahren kommt dafür bisher fast ausschließlich die Biolistik in Betracht. Das Plastidengenom ist hochpolyploid. Eine Tabakmesophyllzelle enthält ca. 100 Chloroplasten, von denen jeder ca. 100 Plastomkopien trägt. Nur wenige Plastome eines Chloroplasten und nur wenige Chloroplasten einer Zelle werden transformiert. Dies erfordert ein wirksames Selektionssystem, welches die nicht transformierten Chloroplasten an der Vermehrung hindern kann. Die Selektionsmarker müssen am Plastidenstoffwechsel angreifen und dürfen cytoplasmatische Stoffwechselwege nicht beeinflussen, d. h. ihre Integration ins Nukleom darf keine Resistenz hervorrufen. Als geeignet erwiesen sich plastomkodierte Resistenzen gegen Streptomycin und Spectinomycin. Diese Antibiotika wirken nicht nur gegen Bakterien sondern hemmen auch Wachstum und Vermehrung der Plastiden, indem sie deren Proteinsynthese blockieren. Die cytoplasmatische Proteinsynthese pflanzlicher und tierischer Zellen wird nicht beeinträchtigt.

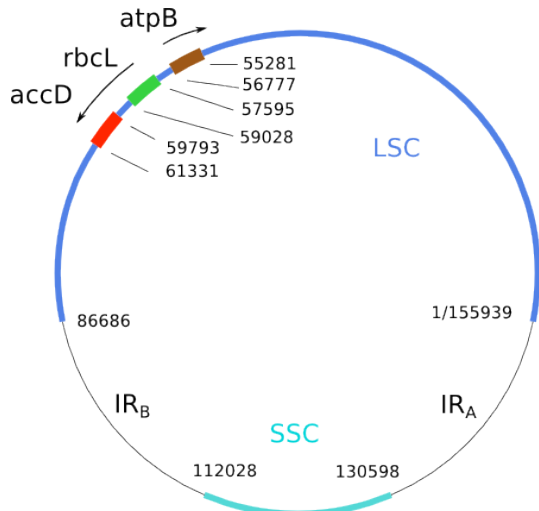


Abb. 20. Grundstruktur des Tabakplastoms. Das Plastom des Tabaks (*Nicotiana tabacum*) ist ein ringförmiger DNA-Doppelstrang mit 155939 Basenpaaren. Seine Sequenzorganisation ist typisch für die Plastome Höherer Pflanzen. Das Ringmolekül besteht aus der großen und kleinen singulären Genregion (large, small single copy region) und zwei gegenläufigen identischen Sequenzabschnitten IRA, IRB (inverted repeat). Das Tabakplastom trägt ca. 120 proteinkodierende Gene und einige tRNA- und rRNA-Gene, die Komponenten des Proteinsyntheseapparats der Chloroplasten sind. Es sind nur drei protein-kodierende Gene, *accD*, *rbcL*, *atpB* eingezeichnet. Sie liegen dicht hintereinander an den angegebenen Positionen in der großen singulären Genregion. Die beiden Pfeile markieren die Transkriptionsrichtung. *accD* kodiert eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase, eines Schlüsselenzyms der Fettsäuresynthese, *rbcL* die große RUBISCO-Untereinheit und *atpB* die β -Untereinheit der ATP-Synthase. (Shinozaki u. a., 1986; Wakasugi u. a., 1998.) Man hat ein *accD-rbcL-atpB*-Tabakplastomfragment kloniert, das *rbcL*-Gen des Tabaks durch das der Sonnenblume ersetzt und das rekombinierte Fragment wieder in einen Plasmidvektor eingesetzt. Mit diesem transformierter Tabak bildet ein funktionelles aus Untereinheiten beider Arten aufgebautes RUBISCO-Molekül. Seine kleinen, vom Nukleom kodierten Untereinheiten stammen vom Tabak, die großen von der Sonnenblume (Kanevski u. a., 1999).

Spectinomycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum aus dem Strahlenpilz *Streptomyces spectabilis*. Das Antibiotikum bindet die 30S-Ribosomenuntereinheit der Bakterien. Es hemmt die prokaryontische Proteinsynthese und ebenso die der Plastiden. Das *aadA*-Gen mancher Colibakterien- und Salmonellenstämme kodiert eine Aminoglykosid-Adenyltransferase, welche das Antibiotikum unwirksam macht und dadurch Spectinomycin- und Streptomycinresistenz verleiht. Das *aadA*-Gen ist das am häufigsten verwendete Selektionsmarkergen zur Produktion von Plastidentransformanten.

Die bei der biolistischen Plastidentransformation (Abb. 21) eingesetzten Vektoren tragen gewöhnlich zwei unmittelbar hintereinander liegende Expressionskassetten. Eine davon trägt das *aadA*-Gen, die zweite das Zielgen, welches den Transplastomikern die gewünschte neue Eigenschaft verleiht. Beide Gene sind von in Plastiden wirksamen Expressionssignalen eingeschlossen. Das DNA-Segment mit den beiden Expressionskassetten wird beidseitig von jeweils einige 100 Nukleotide langen Chloroplasten-DNA-Sequenzen flankiert. In diesen beiden DNA-Bereichen können nun Plasmide, die beim biolistischen Partikelbeschuss von Gewebestücken der Zielpflanze in deren Chloroplasten gelangen, eine sequenzspezifische Watson-Crick-Basen-paarung mit dem Plastom eingehen. Jeweils ein Einzelstrangabschnitt der Plasmid-DNA bildet dabei vorübergehend eine Doppelhelix mit dem komplementären Einzelstrangbereich eines Plastom-moleküls. Bei dem hierdurch eingeleiteten Prozess der homologen Rekombination kommt es zu einem Segmentaustausch zwischen der Plasmid-DNA und dem Plastom, wodurch die zwischen den Rekombinationsstellen liegenden Expressionskassetten mit den Transgenen ins Plastom integriert und die betroffenen Chloroplasten spectinomycin- und streptomycinresistent werden. Durch homologe Rekombination können Marker wie *aadA* an jeder Stelle des Plastoms eingebaut werden, sofern der Einbau keine essentiellen Plastomgene verletzt. Die Promoter- und Terminatorsignale müssen prokaryontischen Charakter haben. Gewöhnlich verwendet man die untranslatierten Signalregionen am Anfang (5'UTR) und Ende

(3'UTR) hoch exprimierter Chloroplastengene.

Bei der biolistischen Transformation des Tabakplastoms werden Tabakblätter mit Plasmid-DNA beschichteten Metallpartikeln beschossen, in kleine Stücke geschnitten und auf ein spectinomycinhaltiges Sprossregenerationsmedium gebracht. Nicht transformierte Plastome können in Gegenwart von Spectinomycin nicht replizieren und gehen deshalb im Laufe der Gewebekultur durch Verdünnung verloren. Die an den beschossenen Blattstücken gebildeten Sprosse sind dennoch aus transformierten und nicht transformierten Zellen aufgebaute Chimären. Der Spross entsteht nicht klonal aus einer einzigen Zelle, sondern aus einem dreilagigen Bildungsgewebe (Meristem), wobei jede Schicht auf 2 oder 3 Stammzellen zurückgeht. Ein transformierter Spross ist nur dann genetisch homogen, wenn er ausschließlich aus transformierten Stammzellen gebildet wurde. Transplastomische Zellen, welche einen Selektionsmarker exprimieren, der wie *aadA* ein Antibiotikum

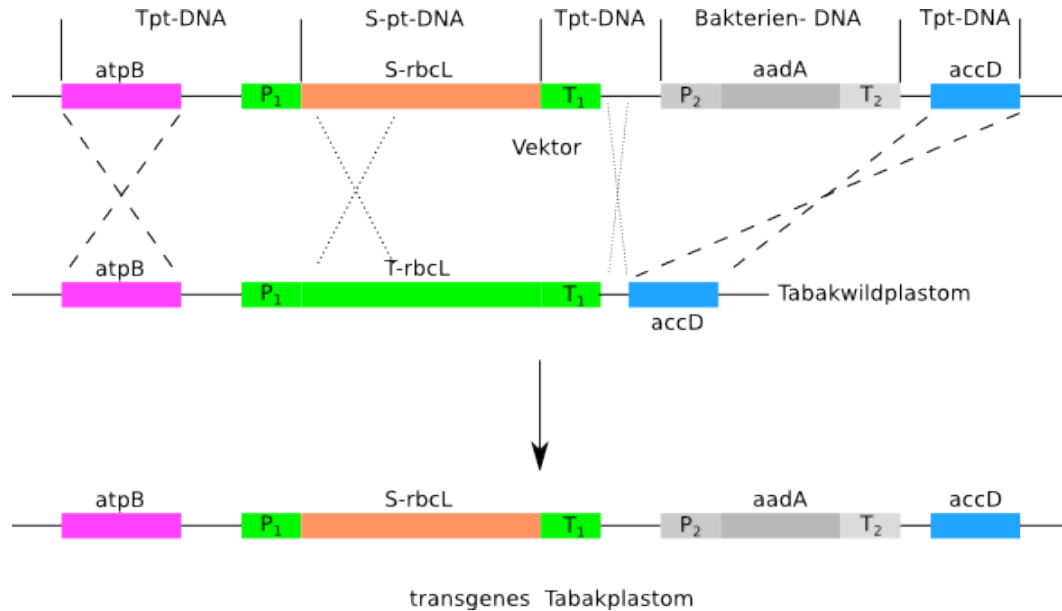


Abb. 21. Transformation des Tabakplastoms mit dem *rbcL*-Gen der Sonnenblume. Die Transformation des Plastoms beruht auf der homologen Rekombination zwischen Plastom-DNA und sequenzhomologen Regionen eines Vektors. Ein *atpB*-*T-rbcL*-*accD*-Fragment des Tabakplastoms wurde in *E. coli* kloniert. Die kodierende Sequenz des *rbcL*-Gens des Tabaks wurde durch die der Sonnenblume ersetzt. Zusätzlich wurde eine bakterielle Spectinomycinresistenz (*aadA*) eingefügt. Die rekombinierte DNA wurde wieder in einen Plasmidvektor eingesetzt, mit welchem Tabakgewebe biolistisch transformiert wurde. Man erhielt homoplastische transgene Tabakpflanzen, welche eine aktive, aus Untereinheiten von Tabak und Sonnenblume aufgebaute Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (RUBISCO) produzieren. Die großen RUBISCO-Untereinheiten stammen von der Sonnenblume, die kleinen, vom Nukleom kodierten, vom Tabak.

Die homologe Rekombination ist im Gegensatz zur Rekombination viraler Rekombinationssysteme nicht ortsspezifisch. Rekombinationsereignisse können deshalb längs der gesamten Homologieregion von Vektor und Plastom eintreten. Ein doppeltes Rekombinationsereignis im *atpB*- und *accD*-Gen (gestrichelt) integriert *S-rbcL* und *aadA* ins Tabakplastom. Rekombinationsereignisse neben dem *aadA*-Gen (punktirt) integrieren nur die Spectinomycinresistenz, und Rekombination in *atpB* und *S-rbcL* (punktirt, möglich wegen der großen Sequenzhomologie von *S-rbcL* und *T-rbcL*) nur einen Teil von *S-rbcL*. Auch andere Plastomregionen lassen sich benutzen, um durch homologe Rekombination mit Vektorsequenzen Plastomgene zu modifizieren oder Fremdgene ins Plastom einzusetzen. (Maliga & Bock, 2011).

Gene: *accD* Acetyl-CoA-Carboxylase; *atpB* ATP-Synthase, β -Untereinheit; *S-rbcL* große RUBISCO-Untereinheit der Sonnenblume; *T-rbcL* große RUBISCO-Untereinheit des Tabaks; *aadA* bakterielle Aminoglykosid-Adenyl-3"-transferase.

P1,2/T1,2 Promoter/Terminator von *S-rbcL/aadA*; Spt/Tpt-DNA Plastom-DNA von Sonnenblume/Tabak.

inaktiviert, können auf ihnen benachbarte nicht transformierte Zellen eine Schutzfunktion ausüben, die dadurch entsteht, dass sie die lokale effektive Konzentration des Antibiotikums senken. Dies ermöglicht es nicht transformierten Nachbarzellen, sich zu teilen und an der Sprossbildung zu beteiligen. Die im ersten Regenerationszyklus regelmäßig beobachtete Chimärenbildung wird hierdurch erklärt. Genetisch stabile Pflanzen mit einer einheitlichen Population transformierter ptDNA (homoplastische Transplastomiker) erhält man durch Regeneration neuer Sprosse aus den chimären Blättern. Im Regelfall braucht man zwei oder 3 Regenerationszyklen, um homoplastische transplastomische Pflanzen zu bekommen. Da das *aadA*-Resistenzgen keinen sichtbaren Phänotyp liefert, konnte der Nachweis der Homoplastie ursprünglich nur zeitraubend mit DNA-Gelblot-Analysen geführt werden. Damit kann unter Verwendung geeigneter DNA-Sonden gezeigt werden, dass eine spectinomycinresistente Transformante keine Plastiden-DNA vom Wildtyp mehr enthält. Es sind visuelle Selektionsmarker entwickelt worden, mit denen sich normale und transformierte Sektoren an den Blättern aus Blattexplantaten regenerierter Sprosse phänotypisch sichtbar machen lassen. *aadA^{au}* (*aurea*; aureus; lat. golden) ist ein rekombiniertes Spectinomycinresistenzgen. *aadA^{au}*-Transplastomiker sind spectinomycin-

resistent und haben gelbgrüne, von den dunkelgrünen Blättern des Wildtabaks gut unterscheidbare Blätter. Die 5'-UTR (5'-untranslated region) von *aadAau* trägt einen regulatorischen Sequenzabschnitt, welcher von einem Plastidengen (*clpP1*) stammt, das eine Untereinheit eines Proteasekomplexes kodiert, welcher für die Chloroplastenentwicklung junger Blätter notwendig ist. Das chimäre RNA-Transkript des *aadAau*-Gens hemmt die Reifung der *clpP1*-mRNA und reduziert den Pegel des ClpP1- Proteins auf die Hälfte. Dies bewirkt den *aurea*-Phänotyp. Man vermutet, dass die hybride *aadAau*-prä-mRNA mit der prä-mRNA des *clpP1*-Gens um einen RNA-Reifungsfaktor konkurriert ([Kuroda u. a., 2002](#)). Die RNA-Interferenz produziert Pflanzen mit reduziertem Wachstum und abweichender Färbung, erhält aber die Wildtypgene und die Fähigkeit zur Photosynthese. Will man phänotypisch normale transplastomische Pflanzen gewinnen, muss der Selektionsmarker nachträglich wieder aus dem Plastom entfernt werden. In abgewandelter Form können dabei die ortsspezifischen viralen Rekombinationssysteme eingesetzt werden, die bereits zur Eliminierung nukleärer Selektionsmarkergene entwickelt worden sind. Auch durch doppelte homologe Rekombination an zwei gleichsinnigen den Selektionsmarker flankierenden Sequenzwiederholungen kann das Markergen wieder aus dem Plastom herausgeschnitten werden. Auf die Eliminierung von Selektionsmarkern kommen wir später zurück.

Bei Pflanzen, von denen albinotische Linien bekannt sind, kann auch die Rekonstitution der Photosynthese zur Selektion homoplastischer Transformanten eingesetzt werden. Albinos, die einen genetischen Defekt des Photosyntheseapparates haben und keine grünen Chloroplasten besitzen, sind auf organischen Nährmedien lebensfähig. Werden Zellkulturen oder Gewebeexplantate dieser Versuchspflanzen mit einem Vektor transformiert, der neben dem Nutzgen ein Gen trägt, das den Photosynthesedefekt ausgleicht, können sich transformierte Plastiden zu grünen photosynthetisch aktiven Chloroplasten entwickeln. Bringt man die Explantate anschließend auf ein mineralisches Nährmedium und belichtet, können sich nur transformierte Chloroplasten vermehren. Während des nun folgenden Regenerationsprozesses werden albinotische Plastiden rasch eliminiert, und man erhält homoplastische Linien ([Klaus u. a. 2003](#)).

Manche Selektionsmarker stammen von Pflanzen, nicht von Bakterien. Sie haben den Vorteil, dass ihre Verwendung ökologisch unbedenklich ist. Anthranilatsynthase (AS) katalysiert den ersten Schritt der Tryptophansynthese und wird durch deren Endprodukt Tryptophan und bestimmte Tryptophananaloge gehemmt. Letztere sind für die Pflanze toxisch, weil sie Tryptophanmangel bewirken. Eine dominante rückkopplungs-unempfindliche AS-Mutante ist resistent gegen das Tryptophan-Analog 7-Methyl-DL-Tryptophan (7MT) und dessen toxischen Vorläufer 4-Methylindol (4MI). Die Expression dieses mutierten AS-Gens in Tabakchloroplasten ermöglicht die Selektion transplastomischer Zellen mit 7MT oder 4MI ([Day u. a., 2011](#)).

Die erste Plastomtransformation gelang 1988 bei der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, die nur einen einzigen großen Chloroplasten besitzt. 1990 erschien der erste Bericht über eine gelungene Plastidentransformation einer Höheren Pflanze ([Svab u. a., 1990](#)). Zur erfolgreichen Plastomtransformation von Nahrungspflanzen existieren bisher nur wenige Beispiele. Transplastomischer Biotechrap wurde erstmal 2003 von [Hou u. a.](#) beschrieben. Die Pflanzen exprimieren das *cryIAa10*-Gen eines *Bacillus-thuringiensis*-Stamms und bilden ein biologisch aktives, für die Raupen der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) giftiges, Bt-Toxin. Die Sterblichkeit der Schmetterlingslarven liegt bei 33 - 47%, und die befallenen Pflanzen werden durch den Insektenfraß nur leicht geschädigt. Allerdings müssen noch mehrere Hürden überwunden werden, bevor transplastomischer Biotechrap kommerziell angebaut werden kann: Die Transformationseffizienz und ebenso die Expression des Bt-Toxins müssen verbessert werden. Es gibt bisher nur heteroplastische Transplastomiker, d. h. solche, die sowohl transformierte als auch normale Chloroplasten enthalten. Um kommerziell verwertbare Biotechsorten züchten zu können, benötigt man aber homoplastische Linien, welche die Transgene stabil an die Nachkommen vererben. Schließlich fehlt ein zuverlässiges Verfahren, mit dem sich transplastomische von nukleären Transformanten sicher unterscheiden lassen. Besonders schwierig ist die Plastomtransformation, wenn die Regeneration durch somatische Embryogenese erfolgen soll. Auf diesem Regenerationsweg gewonnene Transplastomiker von Soja, Karotte und Baumwolle sind jedoch bereits beschrieben worden ([Daniell u. a., 2005](#)). Bei der Sojabohne, die sich bei der Plastomtransformation ähnlich wie Tabak verhält, ist die Entwicklung gegen Herbizide wie Isoxaflutol ([Dufourmantel u. a., 2007](#)) oder Dicamba ([Behrens u. a., 2007](#)) bereits weit fortgeschritten und nähert sich der Marktreife.

2.1.2 Nichtregenerative Transformationsverfahren

2.1.2.1 Blütentauchtransformation

Biolistik und Agrolistik, die beiden wichtigsten bei Nutzpflanzen angewandten Transformationsverfahren, sind in mehr als einer Hinsicht methodisch unbefriedigend. Sie benötigen die Gewebekultur, die Selektion transformierter Zelllinien und die Regeneration von Pflanzen aus unreifen Embryonen oder undifferenziertem embryonem Kallusgewebe. Der gesamte Prozess ist zeitaufwendig, technisch anspruchsvoll und teuer. Die Regeneration birgt zudem die Gefahr somatischer Mutationen und epigenetischer Veränderungen der Genexpression. Da bei beiden Transformationsmethoden Plasmide und Selektionsmarker eingesetzt werden, enthalten die durch Regeneration entstandenen primären Transformanten gewöhnlich Markergene und Vektorsequenzen. Beide sind nach der Regeneration überflüssig und im Genom transgener Pflanzen aus mehreren Gründen unerwünscht. Die konstitutive Expression eines überflüssigen Enzyms stellt für die Pflanze eine Stoffwechselbelastung dar, die ihren agronomischen Wert mindern kann. Der ausgedehnte Anbau von Biotechpflanzen, die funktionsfähige Antibiotikaresistenz-Markergene tragen, könnte mit zwar geringer, aber endlicher Wahrscheinlichkeit die Selektion resistenter Krankheitserreger begünstigen. Von den Zulassungsbehörden wird deshalb empfohlen, transgene Pflanzen, die Resistenzen gegen Antibiotika tragen, welche noch verordnet werden, ausschließlich zu Versuchszwecken anzubauen. Wenn eine transgene Pflanze zur Einführung eines weiteren Merkmals erneut transformiert werden soll, kann das zur Regeneration verwendete Selektionsmittel nicht mehr eingesetzt werden. Dies ist ein Nachteil; denn die Auswahl an Selektionsmarkern, die in der pflanzlichen Gewebekultur verwendbar sind, ist recht begrenzt. Bakterielle Vektorsequenzen werden in der Pflanze zwar nicht exprimiert, könnten aber genetische Rekombinationsvorgänge begünstigen, welche die Vererbungsstabilität der übertragenen Funktionsgene beeinflussen oder ihre Expression verändern.

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* lässt sich transformieren, indem man den Blütenstand einer kompletten Pflanze kurze Zeit in eine Agrobaktériensuspension eintaucht (floral dip transformation). Dies ist möglich, weil der Fruchtknoten der Arabidopsisblüte in den Anfangsstadien der Blütenentwicklung offen und über die Narbe zugänglich ist. In dieser Phase können Agrobakterien in den Fruchtknoten eindringen und den weiblichen Gametophyten infizieren. Wird die Pflanze dann in Erde gebracht, wächst sie weiter und bildet keimfähige Samen. Es werden anscheinend nur postmeiotische haploide Zellen transformiert, aus denen während der Gametophytenentwicklung die Eizellen hervorgehen. Nach der Befruchtung beginnt die Samenentwicklung, und transformierte Eizellen entwickeln sich zu hemizygoten transgenen Embryonen. Ein Chromosom des betroffenen homologen Chromosomenpaars trägt die T-DNA-Insertion, das andere nicht. Ca. 1% - 3% der aus den Samen behandelte Pflanzen gewachsenen Keimlinge haben T-DNA aufgenommen. Sie sind in allen Zellen transgen, und jede transgene Pflanze, die von demselben T₀-Individuum stammt, trägt eine andere T-DNA-Insertion.

Die Methode ist außerordentlich einfach. Sie umgeht die Gewebekultur und damit auch die Gefahr der somaklonalen Variation und Chimärenbildung. Bei *Arabidopsis* wird die Tauchtransformation heute in zahlreichen Laboratorien routinemäßig angewandt und hat den Fortgang der Grundlagenforschung stark beschleunigt, da man mit ihr sehr schnell transgene Pflanzen für die verschiedensten Genkonstrukte bekommt. Die Tauchtransformation ist auch bei anderen Brassicaceen möglich, z. B. dem Hirtentäschelkraut, *Capsella bursa pastoris* ([Bartholmes u. a., 2008](#)). Auch Weizen wurde bereits auf diese Weise transformiert ([Agarwal u. a., 2009](#); [Zale u. a., 2009](#)).

2.1.2.2 Ovarialtropftransformation

Beim Mais ist von [Yang u. a., \(2009\)](#) eine weitere nichtregenerative Transformationstechnik, die Ovarialtropfmethode (ovary drip method; to drip: tropfen, aufträufeln) beschrieben worden. Sie ist eine Weiterentwicklung der älteren Pollenschlauchweg-Transformationsmethode ([Luo u. a., 1988](#); [Zhang u. a., 2005](#)), prinzipiell bei allen sich sexuell fortpflanzenden Pflanzen anwendbar und markerfrei. Beim Mais ist sie wegen der Größe der weiblichen Blüten besonders einfach. Zunächst werden diese künstlich bestäubt. Wenn der Pollenschlauch den Griffel durchwachsen hat und durch die Mikropyle ins Ovar eingetreten ist, schneidet man ein Fenster in den zentralen Teil der Ähre, um die Ovarien freizulegen. Sodann wird der Griffel direkt am Ovarium abgeschnitten, worauf eine DNA-Lösung auf die Schnittfläche aufgetragen wird. Die DNA ist eine lineare Genkassette, welche nur das Transgen mit den erforderlichen Expressionssignalen trägt. Die *input*-DNA kann nun durch den Pollenschlauchkanal zur Mikropyle eines Ovariums diffundieren, in die Eizelle gelangen und wird dann bei der ersten Teilung der befruchteten Eizelle (Zygote) ins zygotische Genom eingebaut. Die Wirksamkeit des Verfahrens ist mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) getestet worden. Die

Expressionskassette besteht aus dem Ubiquitinpromoter, dem GFP-Gen und dem Terminator des Nopalinsynthasegens der Agrobakterien-T-DNA. An die Enden des linearen Konstrukts wurde jeweils eine der 25 bp langen Randsequenzen der T-DNA angefügt. Es wird vermutet, dass diese die eingeschlossene DNA vor dem Abbau durch pflanzliche Nukleasen schützen und außerdem die Integration der Fremd-DNA ins Pflanzengenom erleichtern können. Das Verfahren liefert markerfreie transgene Maispflanzen und erreicht eine Transformationseffizienz von ca. 6,5%. Einige der erhaltenen transgenen Linien tragen nur eine GFP-Kopie, die sich wie ein dominanter Mendelfaktor vererbt.

2.2 Mutagenese

2.2.1 Chemische Mutagenese

Seit vielen Jahrzehnten verwendet man in der Genetik ionisierende Strahlen und chemische Mutagene zur Erzeugung von Mutationen bei Modellorganismen wie der Taufliege *Drosophila melanogaster*, dem kleinen Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis thaliana*. Zahllose Mutanten der Wildformen dieser Organismen sind auf diese Weise entstanden und genau beschrieben worden. Eines der wirksamsten chemischen Mutagene ist Ethylmethansulfonat (EMS), eine einfache organische Verbindung mit der Summenformel $C_3H_8O_3S$. EMS ruft Mutationen in DNA-Doppelsträngen hervor, indem es die Nukleotide verändert, zum Beispiel durch die Alkylierung von Guanin. Bei der DNA-Replikation führt dies zum Einbau eines falschen Nukleotidbausteins an der betreffenden Stelle, wodurch eine Punktmutation entsteht.

Bei Sonnenblume, Weizen, Reis, Raps und Mais hat man durch Behandlung von reifen Samen oder Pollenkörnern mit EMS-Lösungen Mutanten erzeugen können, welche gegen Imidazolinonherbizide wie Imazethapyr, Imazamox u. a. unempfindlich sind. Imidazolinonherbizide kontrollieren Unkräuter durch Hemmung des Enzyms Acetohydroxysäuresynthase (AHAS), auch Acetolactatsynthase. Acetolactatsynthase (ALS) katalysiert die ersten Schritte der Synthese der verzweigten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin. Durch Imidazolinon- und Sulfonylharnstoffherbizide werden beide Enzyme kompetitiv gehemmt, was die Protein- und DNA-Synthese unterbricht und die Pflanze absterben lässt. Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Hemmstoff (Inhibitor) mit dem natürlichen Substrat um das Enzymmolekül und verdrängt das Substrat vom Reaktionszentrum des Enzyms. Zur Erzeugung der Toleranz kann eine einzelne Punktmutation genügen, so dass man die Toleranz in vielen Kulturpflanzen erzeugen kann ([Tan u. a., 2005](#)). Durch EMS-Behandlung von Maispollen sind Punktmutationen in den beiden ALS-Genen des Mais erzeugt worden, welche den Austausch eines Serins gegen Asparagin bewirken. Die katalytische Aktivität des Enzyms wird dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt, jedoch wird die Bindungsaffinität zwischen Imidazolinon und ALS so stark reduziert, dass die Pflanzen in Gegenwart von Imazethapyr wachsen können. Die 1996 in Kanada zum Anbau zugelassene imidazolinontolerante Maislinie EXP1910IT trägt eine EMS-induzierte Punktmutation in einem ALS-Gen.

In Kanada sind auch nicht transgene Canolaliniien zum Anbau zugelassen, welche resistent gegen Imidazolinonherbizide (IT-Canola) oder im Fettsäureprofil verändert sind. IT-Canola wird auch in den USA und in Australien angebaut. Man erhielt diese Sorten aus konventionellem Canola durch Behandlung von Samen oder Pollenbildungszellen mit Ethylmethansulfonat (EMS) oder Ethylnitrosoharnstoff, einem weiteren starken chemischen Mutagen, welches wie EMS DNA angreift und dabei Punktmutationen induziert.

Ein großer Vorteil der EMS-Mutagenese gegenüber der Transformation ist die einfache Technik. Es wird keine fremde DNA in die Pflanzen eingeführt, so dass alle bei transgenen Pflanzen notwendigen Sicherheitsprüfungen entfallen können. Als Nachteil ist zu werten, dass man gewöhnlich sehr viele Samen keimen lassen muss, um einen resistenten Keimling zu finden. Außerdem ist damit zu rechnen, dass neben den erwünschten zahlreiche weitere Mutationen in anderen Genen erzeugt werden. Da diese meistens rezessiv sind, lassen sich ihre Folgen erst nach mehreren Inzuchtgenerationen überblicken. Mutationen sind statistische Ereignisse. Wenn sie Auswirkungen auf den Phänotyp haben, sind diese gewöhnlich negativ.

2.2.2 T-DNA-Insertionsmutagenese

T-DNA erzeugt Insertionsmutationen und kann als Mutagen eingesetzt werden. Mit Einführung der Tauchtransformation bei *Arabidopsis* ist die Mutagenisierung des Arabidopsisgenoms außerordentlich beschleunigt worden. Bis 2006 kannte man bereits die Sequenz von mindestens 340'000 T-DNA-Insertionsstellen des Arabidopsisgenoms, und es gibt T-DNA-Defektmanten für fast alle Arabidopsisgene ([Bent, 2006](#)). Es sind Genomprojekte angelaufen, deren Ziel es ist, T-DNA-Insertionsmutanten von allen 25'000 proteinkodierenden Arabidopsisgenen zu erzeugen, zu analysieren und den Genen biologische Funktionen zuzuordnen ([SIGNAL, 2014](#)).

2.2.3 Chimäroplastie

Weitaus eleganter als die klassische Mutagenese durch ionisierende Strahlen oder mutagene Chemikalien ist die Genkorrektur mit chimären RNA/DNA Oligonukleotiden (Chimäroplastie). Chimäre Oligonukleotide sind kurze, nur etwa 30 Basenpaare lange, doppelsträngige Nukleinsäuren, welche aus einem DNA- und einem

sequenzkomplementären RNA-Strang bestehen. Sequenzspezifische chimäre RNA/DNA Oligonukleotide lassen sich als DNA-Reparaturschablonen verwenden, um an definierten Positionen Punktmutationen in Gene einzuführen. Das chimäre Nukleinsäuremolekül entspricht in seiner Sequenz genau dem Zielgen mit Ausnahme eines Basenpaars, nämlich der Mutation, die erzeugt bzw. korrigiert werden soll. Erstmals 1996 zur Korrektur von Gendefekten wie der Sichelzellenanämie in Säugerzellen angewandt wurde die Methode inzwischen auch benutzt, um Punktmutationen in den AHAS-Genen des Mais zu erzeugen und die Pflanzen dadurch resistent gegen Imidazolinonherbizide zu machen ([Zhu u. a., 2000](#)). Hierzu wurde ein RNA/DNA Oligonukleotid synthetisiert, dessen Sequenz der Umgebung der Aminosäure 621 der AHAS des Mais entspricht. Wird dieses durch Partikelbeschuss in Maiszellen eingeführt, so bewirkt dies in einigen, möglicherweise allen 7 AHAS-Genen, die der Mais besitzt, eine G-A-Substitution im Codon (AGT) des Serins 621, wodurch dieses in ein Asparagincodon (AAT) umgewandelt wird. Die enzymatischen Eigenschaften der AHAS werden hierdurch nicht wesentlich verändert. Die Bindungsfähigkeit des Enzyms für Imidazolinonherbizide wird jedoch so stark herabgesetzt, dass die aus den behandelten Zellen regenerierten Maispflanzen der Behandlung mit dem Herbizid widerstehen. In Pflanzenzellen wird die Oligonukleotidschablone im Verlauf einiger Stunden nach der Einführung wieder abgebaut. Eine Integration ins Genom findet nicht statt. Da keine fremde DNA ins Genom der Pflanzen eingebaut wird, entfallen die bei der Übertragung von Fremdgenen möglichen Komplikationen wie deren allmähliche Stilllegung in den Nachkommen der transformierten Pflanzen, die Abhängigkeit des Expressionsniveaus vom zufälligen Integrationsort und die Beeinflussung der Expression pflanzeigener Gene durch mit dem Transgen übertragene Steuersequenzen. Insofern bildet die Chimäroplastie eine wertvolle Alternative zur Transformation. Auch bei *Arabidopsis*, Tabak, Mais und Reis haben sich Punktmutationen in den AHAS-Genen chimäroplastisch durch zielgerichtete Mutagenese normaler Genotypen mit chimären RNA/DNA-Oligonukleotiden erzeugen lassen und lieferten gegen Imidazolinon- und Sulfonylharnstoffherbizide resistente Pflanzen. ([Zhu u. a., 2000](#); [Okuzaki & Toriyama, 2004](#)). Die bisher erreichbaren Korrekturfrequenzen sind allerdings gering (10^{-4}). Aus dem Gesagten geht auch hervor, dass Chimäroplastie nur dort zur Sortenverbesserung eingesetzt werden kann, wo schon bekannt ist, welche Aminosäure(n) in welchen Proteinen ausgetauscht werden müssen und was dies für Folgen hat.

Alle Züchtungsmethoden bewirken erbliche, d. h. prinzipiell irreversible Veränderungen im Genom des Zuchtprodukts. Ihre phänotypischen Auswirkungen lassen sich bei der Chimäroplastie, die einen gezielten punktuellen Eingriff darstellt, am besten voraussagen. Wie die Beispiele zeigen werden, sind auch die Folgen eines Transformationsereignisses gut vorhersagbar, jedenfalls dann, wenn nur wenige neue Proteine gebildet werden und der Stoffwechsel der Pflanze dadurch anderweitig nicht verändert wird. Weniger gut überschaubar ist das Resultat einer konventionellen Hybridenkreuzung, da man hier viele Gene gleichzeitig neu kombiniert, die dann in nicht vorhersagbarer Weise miteinander in Wechselwirkung treten können. Der Ausgang eines Mutagenisierungsexperiments ist immer unbestimmt. Bei der biologischen Sicherheitsbewertung einer neuen Sorte kommt es demnach nicht auf das Herstellungsverfahren - klassisch oder gentechnisch - an, sondern auf ihre agronomischen, toxikologischen und ökologischen Eigenschaften.

2.3 Optimierung der Genexpression

2.3.1 Transkription, mRNA-Reifung und Translation

Ein Gen ist ein DNA-Abschnitt, der die Sequenzinformation zur Synthese einer RNA enthält. Die Expression proteinkodierender eukaryontischer Gene ist ein mehrstufiger Syntheseprozess, bei dem sich drei klar umrissene Hauptabschnitte erkennen lassen (Abb. 22): die Transkription, die mRNA-Reifung und die Translation. Bei der Transkription gleitet ein Enzymkomplex, die RNA-Polymerase, an der DNA entlang und synthetisiert ein RNA-Molekül, dessen Basenfolge zu einem der beiden DNA-Einzelstränge komplementär und mit der Sequenz des anderen identisch ist. Bei der Transkription wird nur einer der beiden DNA-Einzelstränge, der Matrizenstrang oder Gegensinnstrang (*antisense*-Strang), abgelesen. Die Doppelhelix muss hierzu vorübergehend entwunden werden. Der komplementäre DNA-Strang wird als Sinnstrang (*sense*-Strang) oder kodierender Strang

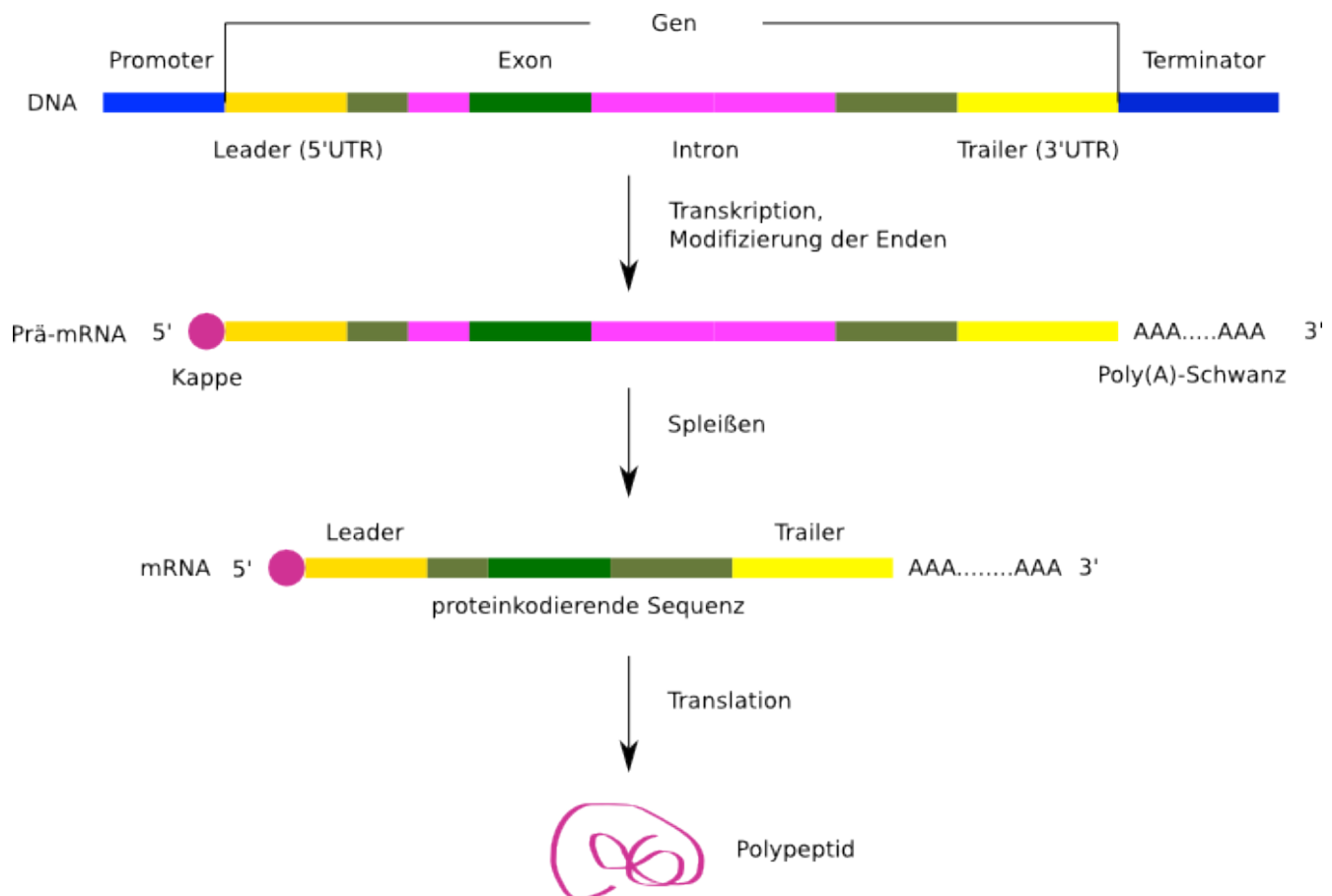


Abb. 22. Das Grundsystem der eukaryontischen Genexpression. Die Struktur der meisten eukaryontischen proteinkodierenden Gene entspricht nicht dem prokaryontischen Kolinearitätsprinzip. Im Unterschied zu bakteriellen Genen bestehen eukaryontische Gene gewöhnlich aus einer Folge proteinkodierender Abschnitte, den Exonen, die durch nichtkodierende Abschnitte, die Introns unterbrochen ist. Die Transkription beginnt an einer definierten Stelle der Promotersequenz und endet am Terminator. Ihr Primärprodukt ist ein prä-mRNA-Molekül, welches wesentlich länger sein kann, als die reife mRNA. Die prä-mRNA wird noch im Zellkern weiterverarbeitet. Das 5'-Ende bekommt eine Kappe, die aus einem kovalent gebundenen Guaninnukleotid besteht. Ans 3'-Ende werden ca. 200 Adeninnukleotide angefügt. Durch einen als Spleißen bekannten Verarbeitungsprozess werden die Introns entfernt und die Exonen in der ursprünglichen Reihenfolge zur reifen mRNA verknüpft. Diese verlässt den Zellkern und wird im Zytoplasma durch die Ribosomen in ein Polypeptid übersetzt. Der Genbegriff ist mehrfach an neue Erkenntnisse angepasst worden und immer noch problematisch. Meist wird die hier zugrundegelegte Definition benutzt. Sie ist auch für RNA-Gene gültig. Leader, Trailer und Intronsequenzen sind hiernach Genbestandteile, Promoter und Terminator jedoch nicht.

bezeichnet. Er hat dieselbe Sequenz wie die RNA. Lediglich Thymin ist in der RNA durch Uracil ersetzt, welches dieselben Basenpaarungseigenschaften wie Thymin hat. Bei der Transkription proteinkodierender Gene wird eine *prä*-mRNA gebildet, die bei Pflanzen und anderen Eukaryonten im Zellkern zu einer meist wesentlich kürzeren mRNA (messenger-RNA) verarbeitet wird. Letztere gelangt an die Ribosomen und dient diesen als Matrize für die Synthese eines Polypeptids, dessen Aminosäuresequenz durch die Basensequenz der mRNA festgelegt ist. Jeweils drei aufeinanderfolgende Basen bilden ein Codon und definieren eine der 20 regelmäßig in Proteinen vorkommenden Aminosäuren. Die Übersetzung einer mRNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz eines Polypeptids bezeichnet man als Translation. Nicht alle Gene kodieren Proteine. Ribosomale Gene kodieren ribosomale RNAs (rRNAs), die Strukturkomponenten der Ribosomen sind. Transfer-RNA-Gene kodieren tRNAs (transfer-RNAs). Das sind spezifische Adaptermoleküle mit zwei Bindungsregionen, der Akzeptorregion und der Anticodonregion. Erstere wird in einer als Aminosäureaktivierung bezeichneten Enzymreaktion mit einer spezifischen Aminosäure beladen. Letztere trägt eine Gruppe von drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden, das Anticodon. Zu jeder der 20 Aminosäuren gibt es mindestens eine tRNA. Die so entstehende Aminoacyl-tRNA kann an ein Ribosom diffundieren und wird von diesem, falls ihr Anticodon zu dem ins Reaktionszentrum des Ribosoms gerückten Codon der mRNA passt, akzeptiert. Die von ihr mitgebrachte Aminosäure wird dann an die wachsende Polypeptidkette angefügt. Die Translation beginnt mit einem Startcodon, fast immer AUG, das auch die Aminosäure Methionin kodiert. Sie endet mit einem der drei existierenden Stoppcodonen UAA, UAG, UGA, die nicht für eine Aminosäure stehen. Wachsende Peptidketten beginnen also meist mit Methionin, welches jedoch nach der Translation wieder abgespalten werden kann. Der genetische Code ist kommafrei. Er enthält kein Strukturelement, welches als Interpunktionszeichen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Codonen wirkt. Punktmutationen in einem proteinkodierenden Gen, welche in der Insertion oder Deletion eines einzelnen Nukleotids bestehen, verändern deshalb das Leseraster (reading frame) und den Sinn der auf die Mutation folgenden Basensequenz. Auf der DNA beginnt ein Leseraster mit einem Startcodon und endet mit einem Stoppcodon. Dazwischen liegt kein weiteres Stoppcodon im gleichen Leseraster und eine durch drei teilbare Anzahl von Basen. Ein offenes Leseraster (open reading frame, ORF) auf der DNA ist ein Leseraster, von dem nicht bekannt ist, ob es jemals in eine Peptidkette übersetzt wird, also ein potentielles proteinkodierendes Gen. Auf der DNA können sich die Leseraster verschiedener Gene überlappen, was bei Bakterien und Viren ziemlich häufig ist. Ein DNA-Abschnitt kann dann die Information für mehrere Proteine tragen.

2.3.2 Genstrukturen

2.3.2.1 Prokaryontische Gene

Prokaryontische Transkriptionseinheiten sind relativ einfach aufgebaut. Sie bestehen im wesentlichen nur aus einem von einem Promoter und einem Terminator eingeschlossenen Leseraster. Bakterielle Transkriptionseinheiten können aus mehreren unmittelbar hintereinander liegenden Genen bestehen, die eine funktionelle Einheit bilden. Diese Einheiten nennt man Operonen. Das *lac*-Operon von *E. coli* (Abb. 23) besteht aus vier Genen, welche dem Bakterium die Verwertung von Milchzucker (Laktose) als Energie- und Kohlenstoffquelle ermöglichen. Das erste Gene, *lacI*, hat einen eigenen Promoter *PlacI* und eine eigene Terminatorregion. Es kodiert einen Transkriptionsfaktor, den *lac*-Repressor. Auf den *lacI*-Terminator folgt ein weiterer Promoter *Plac*, dem die drei nachfolgenden Gene *lacZ*, *lacY*, *lacA* zugeordnet sind, und eine zweite Terminatorregion. *lacZ* kodiert eine β -Galaktosidase. Diese spaltet Laktose in Glucose und Galaktose, die dann verwertet werden. *lacY* kodiert eine Permease, welche den Durchtritt der Laktose durch die bakteriellen Zellwände erleichtert, und *lacA* eine Transacetylase, welche zur Laktoseverwertung nicht notwendig ist. Ihre biologische Funktion ist bis heute unbekannt.

In laktosefreier Umgebung wird nur der konstitutiv exprimierte *lac*-Repressor synthetisiert. Die Transkription der *lac*-Region ist durch den *lac*-Repressor bis auf eine geringe Grundaktivität unterdrückt, die nur ca. 0,1% der vollen Transkriptionsaktivität beträgt. Der *lac*-Repressor erkennt einen 26 bp langen Sequenzabschnitt am Anfang des *lacZ*-Gens, den *lac*-Operator. Durch Bindung des Repressors an den Operator wird die Transkription der *lac*-Region unterdrückt. Der Repressor ist ein aus vier identischen Peptidketten (Monomeren) bestehendes tetrameres Protein. Jede der vier Untereinheiten vermag spezifisch ein Laktosemolekül zu binden. Wenn Laktosemoleküle in die Bakterienzelle eintreten und vom Repressor gebunden werden, verändert der Repressor seine Raumstruktur. Der Operator-Repressorkomplex zerfällt und gibt die Transkription der *lac*-Region frei. Innerhalb weniger Minuten erreicht die Transkription der drei *lac*-Gene ihr Maximum. die Induktion des *lac*-Operons durch den Induktor Laktose ist voll reversibel. Wenn der Induktor verschwindet, geht die Transkription ebenso schnell wie sie aufgebaut wurde wieder auf die Grundaktivität zurück. Durch diese Form der

Genregulation vermeidet es das Bakterium, Enzyme synthetisieren zu müssen, die nicht gebraucht werden, wenn kein Substrat vorhanden ist.

2.3.2.2 Eukaryontische Gene

Exon/Intron-Struktur

Eukaryontische Gene sind komplexer und nicht wie bakterielle Operonen aufgebaut. Auf der Ebene der Transkription wird die eukaryontische Genexpression durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren reguliert, welche miteinander und mit Expressionssignalen der Promotersequenz in Wechselwirkung treten. Detaillierte Feinstrukturanalysen der Promoter licht- und entwicklungsregulierter (Abb. 24) Pflanzengene haben klar gezeigt, dass das Expressionsprofil eines Promoters durch eine bestimmte Kombination relativ kurzer in der Evolution oft gut konservierter Sequenzmotive festgelegt ist und durch Neukombination dieser Signale in charakteristischer Weise verändert werden kann. Zudem gibt es weitere Regulationsmechanismen wie die Methylierung bestimmter Promoterregionen und die Transkriptionsaktivität beeinflussende Veränderungen der Chromatinstruktur der Chromosomen. Der auffallendste Unterschied im Aufbau pro- und eukaryontischer Gene liegt darin, dass das Leseraster letzterer meist durch nicht kodierende Abschnitte, die Intronen, unterbrochen ist. Bei der Verarbeitung des Primärtranskripts werden die Intronen aus diesem entfernt, und gleichzeitig werden die kodierenden Segmente der *prä-mRNA*, die Exonen, in der ursprünglichen Reihenfolge zur reifenden mRNA verknüpft, was auch als Spleißen bezeichnet wird. Es wird im Zellkern parallel zur Transkription von den

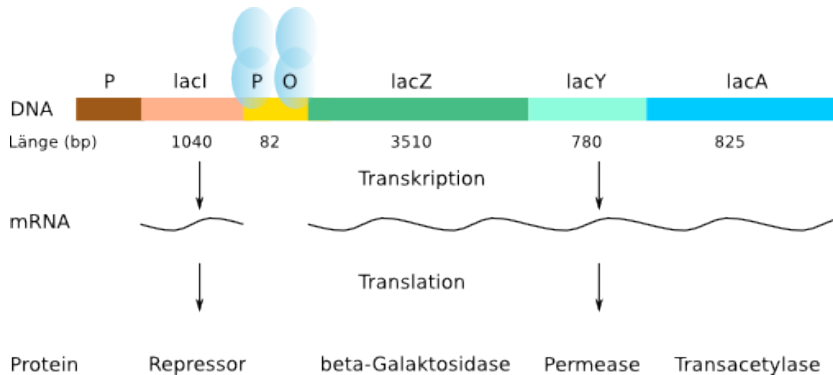


Abb. 23. Das Laktoseoperon von *E. coli* ist ca. 6'000 bp lang und hat 4 Gene, welche den *lac*-Repressor und 3 Enzyme kodieren. Das *lac*-Repressorgen *lacI* hat einen eigenen Promotor und einen eigenen Terminator. *lac*-Promotor und -Operator bilden eine funktionelle Einheit. Der Operator überdeckt die ersten 26 bp des *lacZ*-Gens. Bei in laktosefreiem Medium wachsenden Bakterien ist die Transkription der *lac*-Region durch den *lac*-Repressor, ein tetrameres Protein, das konstitutiv synthetisiert wird unterdrückt. Der Repressor bindet die Operatorsequenz der *lac*-Region und hindert damit die RNA-Polymerase daran, mit der Synthese einer RNA-Kette zu beginnen. Im Nährmedium vorhandene Laktosemoleküle können vom Bakterium aufgenommen werden und mit dem *lac*-Repressor einen Komplex bilden. Jede seiner 4 Untereinheiten bindet ein Laktosemolekül. Dies bewirkt eine Veränderung der Repressorkonformation. Der Repressor fällt vom Operator ab, und die Transkription der *lac*-Region beginnt.

Spleißosomen durchgeführt. Spleißosomen sind große Molekularmaschinen. Hefespleißosomen und menschliche Spleißosomen sind bereits isoliert worden, pflanzliche bisher nicht. Die Spleißosomen der Hefe und des Menschen bestehen aus jeweils 5 Ribonukleinsäuren und ca. 160 Proteinen bei Hefe und mehr als 300 Proteinen beim Menschen. Alle Hefespleißfaktoren haben Sequenzhomologe beim Menschen.

Der Anteil der unterbrochenen Gene eines Organismus nimmt mit seiner Entwicklungshöhe zu. Während bei Hefe 96% aller Gene nicht unterbrochen sind, sind es bei Säugern nur 6%. Auch bei Pflanzen sind 90% der Gene unterbrochen. Zahl und Länge der Intronen nehmen mit steigender Entwicklungshöhe zu. Unterbrochene Gene der Hefe sind kompakt und haben anscheinend nicht mehr als vier Exonen. Säugergene können sehr lang sein. Eines der längsten bekannten eukaryontischen Gene ist das des Dystrophins, eines essentiellen Muskelproteins. Es besteht aus mehr als 60 Exonen, die sich über eine Länge von ca. 2 Mbp im menschlichen Genom verteilen. Dystrophin ist ein ca. 500 kDa großes Muskelprotein. Defekte im Dystrophingen verursachen Duchenne's Muskeldystrophie, eine schwere X-chromosomal vererbte Muskelerkrankung. Die Längenzunahme der Gene, die im Laufe der Evolution zu beobachten ist, beruht auf der wachsenden Zahl und Länge der Intronen. Die Länge der Leseraster veränderte sich kaum.

Die Architektur pflanzlicher und tierischer Gene ist deutlich verschieden. Pflanzengene haben weniger Exonen als tierische und kürzere Intronen. Viele pflanzliche Exonen sind kürzer als 50 bp und die meisten kürzer als

400 bp. Die mittlere Intronlänge beträgt bei *Arabidopsis* 172 Nukleotide, beim Menschen 3000. Bei stammesgeschichtlich verwandten Genfamilien ist die Länge und Sequenz der Exonen viel stärker konserviert als die der

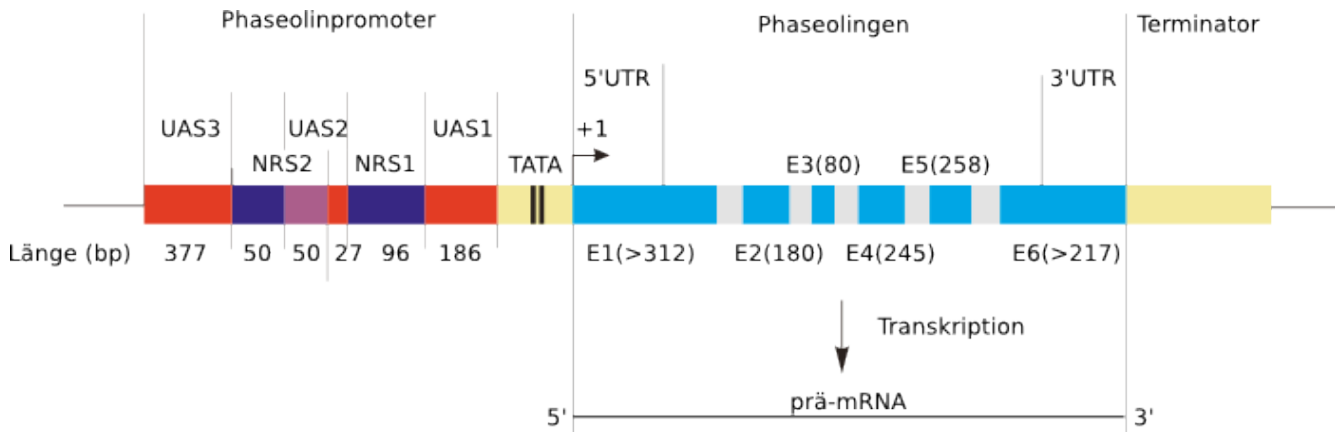


Abb. 24. Operative Gliederung des β -Phaseolins der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*). UAS1 (upstream activating sequence 1) ist ein gewebespezifischer Expressionsverstärker. Er beschränkt die Phaseolinexpression auf Keimblätter und Embryonalachse. UAS2 erweitert die Phaseolinexpression auf das Hypokotyl. UAS3 ist ein allgemeiner Expressionsverstärker. Er wirkt im sich entwickelnden Embryo und ist in allen anderen Geweben stumm. NRS1, NRS2 (negative regulatory sequence 1,2) sind phasenspezifische Expressionsverstärker. Sie beschränken die Phaseolinexpression auf die Embryonalentwicklung. In den 3 UAS-Blöcken sind kurze Sequenzmotive identifiziert, denen sich bestimmte Teilfunktionen des Vollpromoters zuordnen lassen und die in identischer oder sequenzähnlicher Form auch in den Promotern anderer Speicherproteingene vorkommen. Z. B. findet man ein AACCCA-Motiv in UAS1 auch in einem β -Conglycinigen der Sojabohne. In unmittelbarer Nähe des Transkriptionsanfangs liegen zwei TATA-Boxen. Solche Sequenzmotive markieren den Transkriptionsanfang und sind in eukaryontischen Promotern weit verbreitet. Das β -Phaseolingen hat 6 Exonen E1-E6 und 5 Intronen. Die Skizze ist nicht maßstäblich. Die Länge des 1. und 6. Exons ist nicht genau bekannt. ([Bustos u. a., 1991](#); [ENA, 2015](#))

Intronen, deren Sequenz auch bei verwandten Genen so stark divergieren kann, dass Ähnlichkeiten nicht mehr erkennbar sind.

Alternatives Spleißen

Nach der Entdeckung unterbrochener eukaryontischer Gene ging man zunächst davon aus, dass das Spleißen ein konstitutiver Vorgang ist, der immer zu jeder *prä*-mRNA genau eine mRNA liefert, entdeckte aber bald immer mehr Beispiele dafür, dass durch alternatives Spleißen ein- und desselben unterbrochenen Gens mehrere mRNAs mit unterschiedlichen Eigenschaften gebildet werden können. Die raschen Fortschritte der RNA-Sequenzierungstechnik haben es ermöglicht, die Transkriptome zahlreicher verschiedener Zelltypen, Gewebe und Organismen zu vermessen und zu vergleichen. Sie haben gezeigt, dass alternatives Spleißen bei Höheren Organismen verbreitet ist. Bei Pflanzen werden mindestens 60% der diskontinuierlichen Gene alternativ gespleißt. Beim Menschen codieren etwa 95% der Gene alternativ gespleißte mRNAs. Obwohl die Mehrzahl der alternativ gespleißten Gene nur wenige verschiedene Isoformen kodieren, gibt es viele Gene, welche dutzende, hunderte oder gar tausende verschiedener mRNAs bilden können. Das bisher komplexeste Spleißmuster fand man beim *dscam*-Gen (Down syndrome cell adhesion molecule gene) der Taufliege, *Drosophila melanogaster*. *dscam* enthält 115 Exonen, von denen 95 alternativ gespleißt werden. Aus der Exon-Intron-Struktur des Gens errechnet sich eine potentielle Codierkapazität von 38'016 verschiedenen RNA-Isoformen ([May u. a., 2011](#)).

Viele Spleißvarianten eines Gens werden differentiell exprimiert und erscheinen nur in bestimmten Geweben, Entwicklungsstadien oder bei bestimmten Umweltbedingungen. Die Funktionen dieser Varianten sind zum allergrößten Teil noch unbekannt. Unbekannt ist auch, wie viele Spleißvarianten eines Gens biologische Funktionen haben. Möglicherweise erzeugt ein Teil der Spleißungen nur biochemisches Rauschen. Spleißfehler können jedoch zu Entwicklungsstörungen führen und Krankheiten verursachen. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich beim alternativen Spleißen um einen weiteren allgemeinen Mechanismus der posttranskriptionellen eukaryontischen Genregulation handelt. Bei Tieren sind Verbreitung und Komplexität des

alternativen Spleißens anscheinend positiv mit der Entwicklungshöhe korreliert. Die lange als paradox empfundene Tatsache, dass die Zahl der Gene eines Organismus nicht mit seiner Komplexität zunimmt, wird so durch das alternative Spleißen bis zu einem gewissen Grad erklärt. Der Spleißcode, d. h. das Regelwerk, nachdem das Spleißen von den Spleißosomen durchgeführt wird, wurde im Verlauf der Evolution im Gegensatz zum universellen genetischen Code nicht konserviert. Menschliche diskontinuierliche Gene werden überwiegend durch Übergehen einzelner Exonen (exon skipping) alternativ gespleißt und nur selten durch Einspleißen von Intronen (Intronretention). Bei *Arabidopsis* ist es umgekehrt. Tierische Gene werden von Pflanzen nicht korrekt gespleißt und umgekehrt. Wahrscheinlich sind die für die Intronerkenntung zuständigen Sequenzelemente pflanzlicher und tierischer Gene verschieden. Pflanzen und Tiere unterscheiden sich im AU/GC-Gehalt der Spleißstellen, ebenso Mono- und Dikotylen.

Das alternative Spleißen hat potentielle Anwendungen in der Entwicklung transgener Kulturpflanzen, die Spleißvarianten bestimmter Transgene nur unter bestimmten Entwicklungs- oder Umweltbedingungen exprimieren. Voraussetzung solcher Anwendungen ist ein tieferes Verständnis des pflanzlichen Spleißcodes. Bis jetzt wird dies besonders dadurch erschwert, dass ein *in-vitro*-Spleißsystem bisher nur für Tiere entwickelt werden konnte ([Anireddy u. a., 2012, 2013](#)).

2.3.3 Optimierung der Promoterregion

2.3.3.1 Synthetische Promoter

Die Mehrzahl der bisher vermarkteten Biotechpflanzen trägt Transgene, deren Expression von einem starken konstitutiven Promoter wie dem CaMV35S-Promoter gesteuert wird. Dieser Promotertyp bewirkt die Expression des nachgeschalteten Gens in nahezu allen Pflanzenteilen. Soweit es um die Etablierung von Herbizid- und Insektenresistenzen geht, macht dieses Vorgehen durchaus Sinn, da die konstitutive Expression alle Pflanzenorgane während der gesamten Vegetationsperiode schützt. Biotechpflanzen, die ein quantitativ oder qualitativ verändertes Spektrum an gewünschten Inhaltsstoffen produzieren, sollten dies nur während der Reifungsphase in den Organen tun, die auch geerntet werden. So kann vermieden werden, dass Stoffwechsel und Wachstum der übrigen Pflanzenorgane unnötig belastet werden. Es werden laufend aus Pflanzengenomen neue Promotersequenzen isoliert, mit denen sich das zur Realisierung dieser Forderungen notwendige phasen- und gewebespezifische Expressionsverhalten annähern lässt. Zudem erlaubt der systematische Vergleich bekannter Promotersequenzen ein zunehmend tieferes Verständnis der Signalverschlüsselungsstrategien, welche die Natur benutzt, um das Aktivitätsprofil einer Promotersequenz festzulegen. Auf dieser Grundlage ist es heute möglich, teil- und vollsynthetische Promoter mit maßgeschneiderter Expressionscharakteristik zu konstruieren.

Synthetische Promoter sind rekombinierte Promotersequenzen. Sie bestehen aus einer in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunkts liegenden Rumpfsequenz und einer dieser vorgelagerten, im Prinzip beliebigen Kombination relativ kurzer, von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren erkannter Signalsequenzen. Die Rumpfsequenz ist notwendig für die Transkription, hat aber keinen wesentlichen Einfluss auf die Promoterspezifität. Letztere wird durch die Kombination der Steuersignale festgelegt, welche der Rumpfsequenz vorausgehen. Die Rumpfsequenz des CaMV35-Promoters ist nur ca. 45 Basen lang. Sie dient oft als Basis für die Konstruktion synthetischer Pflanzenpromoter mit abgewandelten Expressionsprofilen. Aus der Analyse des kompakten Genoms von *Arabidopsis thaliana* weiß man, dass ein ca. 500 bp langer vor dem Transkriptionsstart liegender DNA-Abschnitt genügen kann, um das Expressionsverhalten eines Pflanzenpromoters festzulegen.

Schon seit geraumer Zeit liefert die Bioinformatik Softwarewerkzeuge zur Optimierung von Proteinsequenzen. Seit kurzem gibt es auch für den Entwurf synthetischer eukaryontischer Promoter konzipierte Webanwendungen ([Cox u. a., 2013](#)). Die diesen zugrundeliegenden Rechenverfahren versuchen einerseits, die in den großen Sequenzdatenbanken vorgehaltene Sequenzinformation zu nutzen, um neue, noch unbekannte Signalsequenzen zu identifizieren, welche von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren erkannt werden und andererseits diese und bereits identifizierte Elemente so miteinander zu kombinieren, dass die resultierende neue Promotersequenz eine bisher nicht realisierte Expressionscharakteristik zeigt. Mit Computern (*in silico*) erstellte Prognosen bedürfen stets einer experimentellen Überprüfung. Um Zeit zu sparen, wird man dabei zunächst ein transientes Expressionssystem verwenden und den neuen Promoter dann, falls er sich wie erwartet verhält, in einer Modellpflanze testen.

Es gibt viele Beispiele, die zeigen, dass das Aktivitätsprofil eines Pflanzenpromoters durch Kombination oder Vertauschung seiner Expressionssignale mit solchen anderer Promoter gezielt verändert werden kann. So gelingt

es beispielsweise, die Gewebespezifität des Mais-Ubiquitinpromoters, der wegen seiner starken Aktivität im Samen häufig für Transformationsexperimente beim Mais verwendet wird, gezielt zu verändern, indem bestimmte DNA-Elemente entfernt und durch solche aus dem Promoter eines Samenspeicherproteingens der Erbse ersetzt werden. Während der ursprüngliche Promoter im Embryo des Samens die größte Aktivität besitzt, ist die modifizierte Form vorwiegend im Endosperm aktiv ([Streatfield u. a., 2004](#)). Viele Pflanzenpromoter sind induzierbar, d. h. sie reagieren auf Umweltsignale wie Licht, Temperaturveränderungen, bestimmte Chemikalien oder den Angriff von Pathogenen oder Schädlingen. Die Verwendung induzierbarer Promoter wird es in Zukunft möglich machen, Resistenzgene in transgenen Pflanzen nur noch bei Bedarf zu exprimieren und die Resistenzentwicklung dadurch zu verzögern.

2.3.3.2 Chemisch induzierbare Promotersysteme zur Schädlingsbekämpfung

Bt-Pflanzen und Resistenzrevolution

Die in den heute angebauten Biotechpflanzen eingesetzten Resistenzgene werden fast ausnahmslos von konstitutiven Promotern wie dem CaMV35S-Promoter geregelt. Solche Promoter sind in den meisten Pflanzenorganen während des gesamten Lebenszyklus der Pflanze aktiv. Dies hat gewisse Nachteile: Wenn ein Fremdprotein über einen längeren Zeitraum in großen Mengen gebildet wird, kann dies für die Pflanze eine Stoffwechselbelastung darstellen und ihre Vitalität beeinträchtigen. Fremdproteine, die in allen Organen gebildet werden, können in die Ernte gelangen, was nur tolerierbar ist, wenn sie gesundheitlich unbedenklich sind. Konstitutiv exprimierte Bt-Toxine oder Herbizide entgiftende Enzyme werden im Feld auch dann gebildet, wenn eine Unkraut- oder Schädlingsbekämpfung wirtschaftlich nicht notwendig ist. So entsteht ein anhaltend hoher Selektionsdruck zugunsten der Evolution herbizid- oder toxinresistenter Unkräuter bzw. Insektenpopulationen. Man kennt mindestens 8 Arten von Schädlingen, die im Labor oder im Feld partielle Resistenzen gegen ein Bt-Toxin zeigen. Von der Kohlschabe (*Plutella xylostella*) kennt man Stämme, die unter Feldbedingungen eine Bt-Resistenz entwickelt haben, allerdings nur gegen die im Biolandbau traditionell verwendeten Bt-Sprühmittel, nicht gegen Bt-Biotechpflanzen im Feld. Zwischen 2008 und 2010 entdeckte man in Baumwollpflanzungen des Yangtse-Tals gegen das Cry1Ac-Toxin partiell resistente Populationen des rosaroten Baumwollkapselbohrers (*Pectinophora gossypiella*). Ihr Resistenzniveau war noch zu gering, um wirtschaftliche Schäden zu verursachen. Auch resistente Stämme des gewöhnlichen Baumwollkapselbohrers (*Helicoverpa armigera*) sind in Populationen gefunden wurden, die über mehrere Generationen unter der Einwirkung des Bt-Gifts standen ([Wan u. a., 2012](#)). Die Langsamkeit der Resistenzentwicklung hat viele Entomologen überrascht, zumal sich im Labor leicht Bt-resistente Mutanten des Maiswurzelbohrers isolieren lassen und man zudem mehr als 500 Insektenarten kennt, die mindestens gegen ein konventionelles Insektizid resistent geworden sind ([Fox 2003](#)).

Es ist bisher nicht zweifelsfrei geklärt, warum im kommerziellen Bt-Pflanzenbau bisher keine den Anbau gefährdenden hochresistenten Schädlingspopulationen gefunden wurden. Als wahrscheinlichste Ursache gilt eine seit dem Jahr 2000 geltende Auflage der amerikanischen Umweltschutzbehörde, nach der Bt-Farmer verpflichtet sind, 20% ihrer Flächen mit konventionellen Sorten zu bestellen. Der Zweck dieser Rückzugsflächen (Refugien) ist es, Schädlingspopulationen zu erhalten, die nicht dem Bt-Toxin ausgesetzt sind und sich mit potentiell resistenten Rassen paaren können, die aus den Bt-Feldern stammen. Auf jedes resistente Insekt sollte so ein Vielfaches nicht resistenter Individuen kommen und dadurch die Verbreitung des Resistenzgens verzögern. Die Refugientechnik ist nach bisherigem Wissen zwar wirksam, hat aber erhebliche Nachteile: Die Notwendigkeit, Rückzugsflächen einzurichten und zu kultivieren, führt zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten, welche die durch den Bt-Pflanzenbau erzielten Einsparungen an Spritzmitteln teilweise aufzehren. Auch lassen sich die Verluste nur schwer begrenzen, da man weder die optimale Größe noch die beste topologische Anordnung der Refugien kennt.

Die wirksamste Methode zur Verhinderung der Resistenzentwicklung gegen jedes Toxin ist die Vermeidung unnötiger Exposition. Bisher registrierte Bt-Pflanzen produzieren das Toxin kontinuierlich unter der Kontrolle konstitutiver Promoter, was einen starken Selektionsdruck zugunsten der Resistenzentwicklung erzeugt. Prinzipiell kann dies vermieden werden, wenn man anstelle konstitutiver Promoter induzierbare verwendet. Letztere haben zwei Funktionszustände, den passiven (nicht induzierten) und den aktiven (induzierten) Zustand. Nur der induzierte Zustand erlaubt die Expression des nachgeschalteten Gens. Der Promoter geht vom passiven in den aktiven Zustand über, wenn ein bestimmtes inneres oder äußeres Signal, z. B. Licht oder eine chemische Verbindung einwirkt. Der aktive Zustand bleibt solange erhalten, wie das Induktionssignal wahrgenommen wird. Verschwindet es, so fällt der Promoter in den Grundzustand zurück. Mit induzierbaren Promotern könnte die

Expression von Resistenzgenen bedarfsgerecht für einen begrenzten Zeitraum ausgelöst werden, ohne dass räumliche Refugien erforderlich sind. Dies kann z. B. geschehen, kurz bevor ein Totalherbizid zum Einsatz kommt, wenn der Schädlingsbefall eine bestimmte Schadensschwelle überschreitet oder wenn nur Teile eines Feldes befallen sind. Damit ein wirksamer Schutz erreicht wird, sollte die Induktion systemisch verlaufen, d. h. der Promoter sollte auch in Zellen und Organen induziert werden, die selbst nicht direkt mit dem Induktor in Berührung kommen, z. B. weil sie von Hüllblättern der Blatt- oder Blütenknospen eingeschlossen sind oder erst nach dessen Anwendung gebildet werden. Für kommerzielle Anwendungen eignen sich als Induktoren besonders bereits zugelassene umweltneutrale wasserlösliche Agrochemikalien. Es sind zahlreiche pflanzliche Promotersysteme bekannt, die durch äußere oder innere chemische Signale gesteuert werden, aber nur wenige, bei denen die Aktivierung systemisch verläuft. Am besten kennt man die systemisch induzierbaren Promoter der Gene bestimmter Formen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Pathogenese Proteine und systemisch erworbene Krankheitsresistenz

Die Infektion einer Pflanze mit einem Krankheitserreger bewirkt gewöhnlich eine abgestimmte, vom Genotyp des Wirts und dem des Pathogens festgelegte Wirtsreaktion. Sind Erreger und Wirt kompatibel, kann die Infektion die gesamte Pflanze erfassen. Bei einer inkompatiblen Reaktion dagegen bleibt sie auf die unmittelbare Umgebung der Infektionsstelle beschränkt, die oft in Form lokaler Läsionen auf den Blättern sichtbar ist. Diese lokale Abwehrreaktion nennt man hypersensitive Antwort (HR, hypersensitive reaction). Nachfolgend triggert die HR einen allgemeinen Resistenzmechanismus, der nicht infizierte Teile der Pflanze weniger empfindlich gegenüber weiteren Angriffen des Pathogens macht, was man als systemisch erworbene Resistenz bezeichnet (systemically acquired resistance, SAR). Die Auslösung der HR und SAR ist von der koordinierten Induktion einer heterogenen Gruppe von Proteinen, den PR-Proteinen (pathogenesis related), in den infizierten und nicht infizierten Blättern begleitet. Diese Proteine werden nach Infektion von der Pflanze gebildet und zumindest teilweise im Zellwandraum akkumuliert. Sie enthalten u. a. Chitinase und 1,3- β -Glucanase, zwei hydrolytisch wirkende Enzyme, die spezifisch gegen das Chitin und die Kallose pilzlicher Zellwände gerichtet sind.

PR-Proteine wurden zuerst in Tabakpflanzen beschrieben, die mit dem Tabakmoxsaikvirus infiziert waren und die HR zeigten. Verwandte Proteine hat man inzwischen im ganzen Pflanzenreich sowohl bei Mono- als auch bei Dikotylen gefunden. Im Tabak sind heute 7 Familien von PR-Proteinen bekannt. Ihre biologischen Funktionen sind unklar. Da sie in erheblichen Mengen auch in gesunden Pflanzen beim Übergang zur Blütenbildung gebildet werden, spielen sie wahrscheinlich eine Rolle in der Pflanzenentwicklung. Unklar ist auch, wie die Infektion einer Pflanze durch einen Krankheitserreger die Aktivierung der PR-Gene bewirkt. Sie werden nicht nur lokal an der Infektionsstelle, sondern systemisch auch in nicht infizierten Pflanzenteilen aktiviert. Während der Infektion beobachtet man sowohl an der Infektionsstelle als auch in den benachbarten Organen einen starken Anstieg der Konzentration endogen gebildeter Salicylsäure. Auch durch Besprühen der Blätter mit Salicylsäure und strukturverwandten Verbindungen sind die PR-Gene induzierbar. Deshalb sieht man in der Salicylsäure einen endogenen Regulator der Pathogenabwehr und der PR-Genexpression. Man nimmt an, dass im infizierten Gewebe ein noch unbekannter Transmitter gebildet wird, der in die Leitungsbahnen gelangt und sich so in der Pflanze verteilt. Der Transmitter soll den Anstieg der Salicylsäurekonzentration bewirken und dieser dann die PR-Gene aktivieren.

Chemische Induktion der Synthese des Cry1Ab-Toxins beim Broccoli-Kohl

Ein besonders gut charakterisierter PR-Promoter ist der des PR-1a-Proteins des Tabaks. Er wird während der HR induziert, antwortet aber auch auf exogene Salicylsäure und synthetische Strukturanaloga der Salicylsäure wie Acibenzolar-S-methyl (ASM, auch BTH). ASM ist ein zugelassenes Fungizid. Es wirkt, indem es das Wachstum phytopathogener Pilze hemmt und gleichzeitig die HR der Pflanze auslöst. Wenn man PR-1a des Tabaks mit *cry1Ab* von *Bacillus thuringiensis* verknüpft und das erhaltene Konstrukt benutzt, um den mit Raps eng verwandten Broccoli-Kohl (*Brassica oleracea*) zu transformieren, erhält man transgene Broccolipflanzen, in denen sich die Synthese des Bt-Toxins durch Besprühen mit ASM oder Salicylsäure auslösen lässt. Es lässt sich dann testen, wie die Larven Bt-empfindlicher Insekten reagieren, wenn sie an induzierbaren Bt-Broccolipflanzen fressen (Cao u. a. 2006).

Wirksamkeit und Induktionskinetik des Cry1Ab-Toxins im Bt-Broccoli

Der PR-1a-Promoter hat eine ähnliche Induktionskinetik wie der 35S-Promoter des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV). Wenn man mit einer PR-1a/*cry1Ab*-Expressionskassette transformierten Broccoli mit ASM besprüht, bildet er innerhalb von 2-3 Tagen große Mengen des Cry1Ab-Toxins. Mit 800 ng/mg des wasserlöslichen

Gesamtproteins des Blattgewebes erreicht die Toxinproduktion bereits am dritten Tag nach der Induktion ihr Maximum und bleibt 7 Wochen lang annähernd auf diesem Niveau. Dann fällt sie stark ab, und gleichzeitig beginnen die Blätter sichtbar zu altern. Vollinduzierte Blätter bewirken die sichere Abtötung aller Larvenstadien der Bt-empfindlichen Rassen der Kohlschabe (*Plutella xylostella*), die zu den wichtigeren Rapsschädlingen gehört. Ausgewachsene Larven, die bei Anwendung des Induktors bereits kurz vor der Verpuppung stehen, können die Behandlung jedoch überleben. Das Toxin gewährt somit einen zwar nicht vollständigen, aber wirksamen Schutz gegen die Bt-empfindlichen *Plutella*-Genotypen.

Mit dem ELISA-Test (enzyme linked immunosorbent assay), einem spezifischen und sehr empfindlichen immunologischen Nachweisverfahren für Proteine, wird in jungen nicht induzierten Blättern kein Cry1Ab-Protein gefunden. An mehr als 3 Wochen alten Blättern fressende Larven wachsen aber langsamer und haben eine erhöhte Sterblichkeit. Deshalb ist anzunehmen, dass auch in nicht induzierten Blättern geringe Mengen des Bt-Toxins gebildet werden. In älteren nicht induzierten Blättern gefundene Toxinmengen sind so hoch, dass sie das Wachstum der Larven erheblich beeinträchtigen.

Systemische Ausbreitung des Induktionssignals

Das in ASM-behandelten Blättern gebildete Induktionssignal breitet sich wie bei der natürlichen Pathogenabwehr systemisch in der Pflanze aus. In Blättern, die erst nach der Induktion erscheinen, findet man mit wachsender zeitlicher und geometrischer Entfernung vom induzierten Blatt abnehmende Toxinmengen. Die ersten beiden neu gebildeten Blätter haben noch eine für die Larven letale Toxinkonzentration. Im dritten und vierten Blatt findet man noch 300 ng/mg TSP, was einer Mortalität von 80 - 100% entspricht; im 5. und 6. sind es noch 76 ng/mg TSP. Die Sterblichkeit der Larven liegt dann immer noch bei 60%. Sie ist strikt mit der Toxinkonzentration korreliert und erst beim 8. Blatt auf 0 gesunken. Die Schutzwirkung gegen den Insektenfraß bleibt bis 3 Wochen nach der Induktion erhalten.

Praxistauglichkeit und Entwicklungspotential des PR-1a/Bt-Induktionssystems

Der schnelle Aufbau und die stetige Erhaltung eines hohen Expressionsniveaus, die systemische Ausbreitung des Induktionssignals und die Tatsache, dass der ASM-Induktor unter Feldbedingungen einsetzbar ist, machen den PR-1a-Promoter zu einem attraktiven Mittel für die chemische Regulation agronomisch nützlicher Gene. Für die Schädlingsbekämpfung ist dieses System jedoch trotz dieser Vorzüge in seiner bisherigen Form nur bedingt geeignet: 1. Da der bisher erreichte Schutz unvollständig ist, wäre es mindestens bei starkem Befall eines Feldes vermutlich notwendig, die ASM-Behandlung mehrmals vorzunehmen. 2. Der PR-1a-Promoter ist undicht. Er zeigt in Abwesenheit des Induktors eine zwar geringe, aber biologisch wirksame Aktivität. Sie bewirkt die allmähliche Akkumulation geringer Mengen des Bt-Toxins in nicht induzierten Blättern. Das ist kontraproduktiv, weil geringe Giftdosen, wenn sie längere Zeit einwirken, die Resistenzentwicklung erfahrungsgemäß stärker begünstigen als hohe. 3. Der PR-1a-Promoter ist nicht absolut spezifisch. Er reagiert nicht nur auf Salicylsäure und ihre Strukturanalogen, sondern auch auf unbekannte Verbindungen, die von der Pflanze unter bestimmten Entwicklungsbedingungen gebildet werden. Dafür spricht die Undichtigkeit des Promoters und die eingangs erwähnte Aktivierung von PR-Proteinen bei Beginn der Blütenbildung. 4. Das nach ASM-Behandlung gebildete Induktionssignal breitet sich zwar vom behandelten Blatt in neu gebildetes Gewebe aus; die Signalstärke fällt aber mit wachsender zeitlicher und räumlicher Entfernung vom Ort der Behandlung. Beim Broccoli erscheint alle 3 - 4 Tage ein neues Blatt. Blätter die nach dem vierten Blatt gebildet werden, das nach einer ASM-Behandlung erscheint, produzieren gewöhnlich weniger als 80 ng Toxin pro mg TSP und können das Larvenwachstum nicht mehr aufhalten. Die ASM-Behandlung muss deshalb bisher alle 2-3 Wochen wiederholt werden, wenn die Pflanze vollkommen gegen den Insektenfraß geschützt werden soll.

Die genannten Probleme gehen alle auf das nicht voll befriedigende Induktionsverhalten des PR-1a-Promoters zurück. Um sie zu lösen, sind im wesentlichen zwei Wege denkbar: Einmal kann man sich im Pflanzen- und Tierreich nach geeigneteren Promotern umsehen, die man mit einem Bt-Toxingen koppeln könnte. Da die Undichtigkeit des Promoters wahrscheinlich daran liegt, dass er auf endogene, von der Pflanze selbst gebildete Signale reagiert, sind chemisch induzierbare Promoter, die nicht aus Pflanzen stammen, zum Zweck der Schädlingsbekämpfung möglicherweise die bessere Wahl. Die Verpuppung der Insekten wird durch das Hormon Ecdyson ausgelöst, welches die an der Verpuppung beteiligten Gene aktiviert. Der Ecdysonpromoter reagiert wahrscheinlich nicht auf pflanzliche Signalstoffe, ist aber leicht durch synthetische Ecdysonagonisten wie Methoxyfenozid aktivierbar. Methoxyfenozid ist ein zugelassenes Pflanzenschutzmittel und vermag sich systemisch in der Pflanze auszubreiten ([Cao u. a. 2006](#)). Eine andere Strategie wäre die Optimierung der PR-1a-

Sequenz mit dem Ziel, die basale Promoteraktivität zu eliminieren. Die modulare funktionelle Architektur des PR-1a-Promoters ist bereits gut untersucht. So weiß man, dass im oberen, der kodierenden Sequenz abgewandten, Bereich des Promoters ein Sequenzelement (TGACG) doppelt vorhanden ist, welches die Induzierbarkeit des Promoters durch Salicylsäure und ASM bewirkt. Ein ähnliches Sequenzmotiv fand man schon früher im CaMV35S-Promoter. Setzt man dieses anstelle des TGACG-Motivs in den PR-1a-Promoter ein, wird die Expression PR-1a-gesteuerter Reportergene in transgenen Modellpflanzen um den Faktor 3 gesteigert ([Grüner u. a. 2003](#)). Durch systematische Optimierung der Promotersequenz sollte es deshalb möglich sein, das Expressionsverhalten des PR-1a-Promoters soweit zu verbessern, dass er für praktische Anwendungen zur Insektenbekämpfung einsetzbar wird. Da PR-Gene unter natürlichen Bedingungen nicht nur durch Pathogene aktiviert werden können, sondern auch durch Fraßfeinde, ist es vorstellbar, ganz ohne den Induktor auszukommen und Pflanzen zu entwickeln, die den Insektenbefall von sich aus mit der Synthese von Bt-Toxinen beantworten.

Im Hinblick auf die Evolution Bt-resistenter Schädlinge sei abschließend erwähnt, dass Bt-Toxine nicht die einzigen natürlichen Gifte sind, die zur Bekämpfung von Schadinsekten infrage kommen. In den Raps ist bereits eine neuartige Kombination zweier Toxingene eingeführt worden, die eine spezifisch gegen das Chitin des Außenskeletts der Insekten gerichtete Chitinase und ein insektenspezifisches Skorpiongift kodieren. Einige der erhaltenen Transgeniker exprimierten die beiden Proteine so stark, dass sie dadurch resistent gegen eine Kohlschabeart (*Plutella maculipennis*) geworden waren. Beide Transgene vererben sich im Raps nach den Mendelschen Regeln ([Wang u. a. 2005](#)).

2.3.4 Optimierung des kodierenden Genbereichs

2.3.4.1 Prokaryontische Gene

Entfernung aberranter Terminationssignale

Manche Bakteriengene werden in Pflanzen schlecht oder nicht transkribiert, selbst dann, wenn sie mit pflanzlichen Promotern und Terminatoren versehen sind. Man beobachtete dies bereits bei den ersten insektenresistenten Tabak- und Tomatenpflanzen, welchen ein Bt-Toxigen übertragen worden war. Verschiedene rekombinierte Bt-Gene, welche aus einem Pflanzenpromoter, einer vollständigen Bt-Sequenz und einer pflanzlichen Transkriptionsterminator-Region bestehen, werden in diesen Modellpflanzen nicht exprimiert. Die Verkürzung der kodierenden Sequenz nativer Bt-Gene bis auf etwa die Hälfte vom 3'-Ende des Gens her verbessert die Expression soweit, dass die Bt-mRNA in transgenen Pflanzen gut nachgewiesen werden kann. Wie Befallsstudien mit Insekten zeigen, bleibt die insektizide Wirkung des Proteins trotz der Verkürzung des Gens erhalten. 1987 unternommene Feldversuche mit Bt-Tomaten zeigten, dass eine verkürzte Version von *cryIAb* den Tabakswürmer (*Manduca sexta*) vollständig unter Kontrolle hielt und die Schädigung des Maiszünslers (*Helicoverpa zea*) stark gemildert wurde. Die Expression war aber immer noch zu niedrig, um eine kommerzielle Nutzung sinnvoll erscheinen zu lassen. In der Baumwolle führte die Expression des verstümmelten Gens nur zu einer geringen Expression und nicht zu einer Insektenresistenz. Später entdeckte man potentielle Polyadenylierungssignale (AT-reiche Abschnitte und ATTTA-Sequenzen) in einem 30 bp langen Segment der kodierenden Sequenz, welche in den Wirtspflanzen anscheinend als Transkriptionsterminatoren gelesen werden und die Expression verringern. Eliminierung dieser Sequenzen steigerte die Expression auf das 10-fache und ermöglichte schließlich die Entwicklung von Bt-Baumwollsorten, mit signifikant höheren Bt-Toxinkonzentrationen und einem wesentlich höheren Resistenzniveau. Nach Entfernung der störenden Signalsequenzen erwies es sich nicht mehr als notwendig, das Gen zu verkürzen, um die Expression zu steigern. Die erste marktfähige Bollgard-Baumwolle trug ein unverkürztes synthetisches *cryAc*-Gen unter Kontrolle des CaMV35S-Promoters.

Anpassung der Codonhäufigkeit an den Codongebrauch des Wirts

Der genetische Code besteht aus den 64 möglichen Dreierkombinationen (Tripletts) der vier in der mRNA vorkommenden Basen A, U, C und G. Drei davon (UAA, UAG, UGA) sind Stoppcodonen und bewirken den Abbruch der Translation. Jedes der verbleibenden 61 Codonen steht für eine Aminosäure. Da nur 20 Aminosäuren bei der Translation eingebaut werden, muss es zu manchen Aminosäuren mehr als ein Codon geben. Mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan trifft dies auch auf alle Aminosäuren zu. Z. B. kodieren die Codonen (GUX; X = U, C, A, G) alle die Aminosäure Valin. Zwar ist der genetische Code, von kleineren Abweichungen bei manchen Einzellern und in der DNA der Mitochondrien abgesehen, universell. Der

Codongebrauch, d. h. die Häufigkeit, mit welcher eines von mehreren dieselbe Aminosäure kodierenden Codonen benutzt wird, kann bei artverschiedenen Organismen aber deutlich verschieden sein. Die Expression eines Transgens kann wesentlich gesteigert werden, wenn man seine Sequenz an den Codongebrauch des Wirts anpasst, indem man Codonen, welche er nur selten für eine bestimmte Aminosäure benutzt, durch solche, die er oft benutzt, ersetzt. Die verbesserte Expression der in den ersten Produktionslinien der Bollgard-Baumwolle benutzten rekombinierten Bt-Gene erzielte man nicht nur durch die Entfernung aberranter Transkriptionssignale sondern auch durch die Anpassung der Codonverwendung an die der Baumwolle ([Perlak, 2001](#)).

Ähnlich wie bei der Bt-Baumwolle erreichte man bei auch bei der Entwicklung insektenresistenter Zuckerrohrvarietäten zunächst keine ausreichende Expression der Bt-Toxingene. Wie Baumwolle kann auch Zuckerrohr durch Schmetterlingsraupen stark geschädigt werden. In China verursachen Insekten jährliche Ernteverluste von 10%, von denen 7% allein auf den Stengelbohrer *Proceras venosatus* entfallen. Durch konventionelle Züchtung entstandene insektenresistente Zuckerrohrvarietäten gibt es nicht, und die Entwicklung marktfähiger Bt-Zuckerrohrvarietäten scheiterte bisher an der zu geringen Expression der Bt-Gene. Bei Pflanzen und Tieren sind GC-reiche DNA-Regionen transkriptionsaktiver als GC-arme. Erstere sind sterisch flexibler, und dies begünstigt offene, die Transkription erleichternde, Chromatinkonformationen. Der GC-Gehalt der DNA von *Bacillus thuringiensis* beträgt ca. 37%, derjenige des Zuckerrohrs 55%. Bei *cryIAc* kann der GC-Gehalt durch Austausch synonymmer Codonen von 37,4% auf 54,8% ohne Veränderung der Aminosäuresequenz gesteigert werden. Mit diesem Gen transformiertes Zuckerrohr ist im Feld gegen den Angriff des Stengelbohrers geschützt ([Weng u. a., 2011](#)).

2.3.4.2 Eukaryontische Gene

Die meisten bisher in Nutzpflanzen eingeführten Fremdgene entstammen Bakterien. Lauricatraps, welcher eine Thioesterase des kalifornischen Lorbeers *Umbellularia californica* bildet und eine Biotechsojavariante, die durch Überexpression einer wirtseigenen Fettsäuredehydrogenase ein hochwertigeres Öl liefert, gehören zu den wenigen Ausnahmen. Auch bei eukaryontischen Genen, vor allem solchen, die nicht von Pflanzen stammen, kann die Expression verbessert werden, wenn die kodierende Sequenz so gestaltet wird, dass der Codongebrauch der Wirtspflanze berücksichtigt ist und die Sequenz keine Segmente enthält, welche die Transkription im Wirt beeinträchtigen. Da es keinen universellen Spleißcode gibt und derjenige der Pflanzen unbekannt ist, muss auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass heterologe eukaryontische Transgene Sequenzelemente enthalten, welche von den Spleißosomen des Wirts als Spleißsignale verstanden werden. Die *prä*-mRNA des Transgens kann dann durch destruktives Spleißen funktionsunfähig werden. Nicht notwendig ist es dagegen, ein komplettes diskontinuierliches Gen einschließlich der Intronen zu klonieren und damit eine Pflanze zu transformieren, wenn diese nur eine mRNA-Isoform synthetisieren soll. Zur korrekten Translation eines unterbrochenen Leserahmens sind die Intronen nämlich nicht erforderlich. Das Gen des Phaseolins trägt 5 Intronen (Abb. 24). Seine mRNA kann mit enzymatischen Standardmethoden *in vitro* in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben und diese dann mit den Promoter- und Terminatorsequenzen des nativen Phaseolins verknüpft werden. Im transgenen Tabak wird dieses Konstrukt exprimiert und liefert intakte Phaseolin-mRNA und Phaseolin mit der richtigen Aminosäuresequenz ([Chee u. a., 1986](#)).

2.4 Optimierung der Genfunktion

2.4.1 Proteine sind modulare Makromoleküle

Unter natürlichen physikalisch-chemischen Bedingungen beginnt sich die Polypeptidkette eines neu gebildeten Proteinmoleküls schon während der Translation zu falten und bildet eine durch die Aminosäuresequenz festgelegte komplexe Raumstruktur (Konformation). Die Bildung und Erhaltung der natürlichen Proteinkonformation ist Voraussetzung dafür, dass das Protein seine biochemische Funktion erfüllen kann. Ähnlich wie Promotersequenzen haben auch viele Proteine einen modularen Aufbau. Bestimmte, meist, aber nicht immer, kohärente Abschnitte der Peptidkette formen bestimmte Molekülteile (Domänen), die definierte Teilfunktionen des Moleküls erfüllen. Die vier identischen Peptidketten des *lac*-Repressor von *E. coli* z. B. haben mehrere Domänen (Abb. 25). Das Kopfstück besteht aus den ersten 45 Aminosäuren und bildet die DNA-Bindungsdomäne. Dieser Molekülteil ermöglicht die Bindung an eine Hälfte der annähernd punktsymmetrischen (palindromischen) Operatorsequenz. Die zweite Hälfte wird vom Kopfstück eines zweiten Repressormonomers

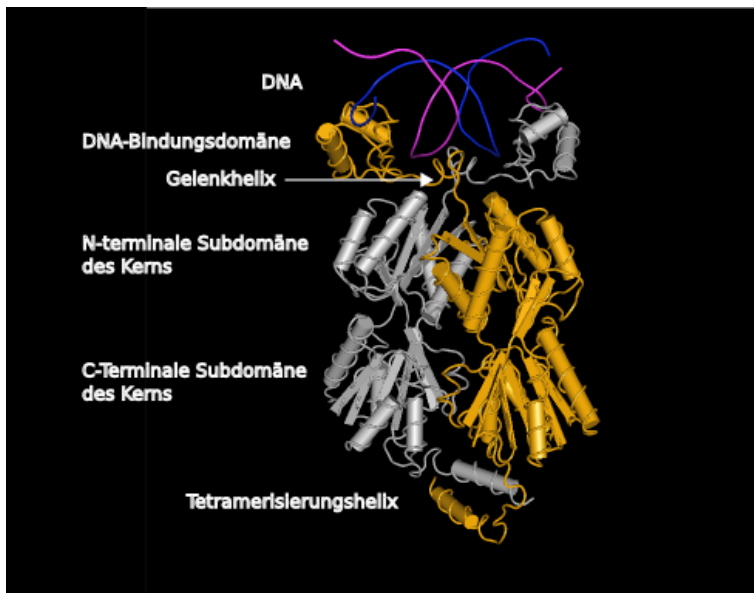


Abb. 25. Molekülgrafik des *lac*-Repressor/Operatorkomplexes. Jedes der beiden Monomere des *lac*-Repressor bindet eine Hälfte der palindromischen (punktsymmetrischen) 21 bp langen Operatorsequenz des *lac*-Operons. Die Peptidkette des monomeren Repressors besteht aus 4 funktionellen Domänen. Vom N- zum C-terminalen Ende folgen die DNA-Bindungsdomäne (Kopfstück) mit den Aminosäuren (AS) 1-45, die Gelenkregion (AS 46-62), die Ligandenbindungsdomäne (Kernregion, AS 63-329) mit 2 deutlich abgegrenzten Subdomänen und die Tetramerisierungshelix (AS 340-357). Letztere vermag ein weiteres Repressormonomere zu binden. Der vollständige Operator/Repressorkomplex besteht aus 4 Monomeren und kann gleichzeitig zwei Operatorsequenzen binden ([Kercher u. a., 1997](#); NCBI Molecular Modeling Database ([MMDBa, 2015](#)); Protein Data Bank ([PDBa, 2015](#)).

gebunden. Der Kern jedes Monomers besteht aus zwei weiteren Domänen mit sehr ähnlicher Struktur. Diese beiden Domänen bilden eine Furche, welche den Induktor Laktose aufnimmt. Jede der beiden Domänen enthält vier spiralförmig gewundene Abschnitte (α -Helices). Die Helices der Kerndomänen der vier Monomere assoziieren und bilden die tetramere, aus zwei Dimeren bestehende Repressorstruktur. Sie wird durch Wasserstoffbrücken und andere nicht kovalente chemische Bindungen zusammengehalten, die zwischen den Helices der Monomere ausgebildet werden. Die palindromische Symmetrie der Operatorsequenz findet ihre Entsprechung in der Symmetrie der dimeren Repressorstruktur. Es genügt ein Dimer, um den Operator des *lac*-Operons zu binden und die Transkription der drei *lac*-Gene zu blockieren. Da der native Repressor aus zwei Dimeren aufgebaut ist, kann er zwei Operatorsequenzen gleichzeitig binden. In der Umgebung des *lac*-Operons sind weitere, schwächere Operatorsequenzen gefunden worden, welche mit der DNA-Bindungsdomäne des *lac*-Repressors kompatibel sind. Sie sind weit genug vom *lac*-Operon entfernt, um der *E.-coli*-DNA eine Schleifenbildung zu ermöglichen, welche diese Zusatzoperatoren in die Nähe des Operator/Repressor-Komplexes bringt und eine Bindung an das freie Repressordimer ermöglicht. Die biologische Funktion dieses Mechanismus ist allerdings unklar ([Kercher u. a., 1997](#)).

Auch viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren, Enzyme und andere Proteine sind modular aufgebaute Moleküle. Transkriptionsfaktoren haben Domänen für die Erkennung von Promotorelementen, die Transkriptionsaktivierung oder die Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen. Enzyme haben Domänen für die Substratbindung, regelbare Enzyme auch solche für die reversible Bindung als Inhibitoren oder Aktivatoren wirkender Metaboliten oder für reversible, die Enzymaktivität steuernde Phosphorylierungsreaktionen. Ein Teil der an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisierten Proteine verbleibt nicht im Zellplasma, sondern wird in die Chloroplasten, Mitochondrien oder ins endoplasmatische Reticulum exportiert. Die Peptidketten dieser Proteine beginnen mit Transitsequenzen,

welche eine Signal-domäne bilden. Sie hat die Funktion einer Adresse und bewirkt den Transport des Proteins an seinen Bestimmungsort. Dort ist die Signalsequenz nicht mehr notwendig und wird beim Durchtritt des Moleküls durch die Membran der Zielorganelle abgespalten. Viele pro- und eukaryontische Proteine sind aus mindestens zwei Untereinheiten aufgebaute Oligomere. Die Untereinheiten oligomerer Proteine sind im allgemeinen nicht durch kovalente Bindungen verknüpft, besitzen aber Domänen, welche Kontaktregionen und Haftpunkte für den Zusammenhalt der Monomeren bereitstellen.

2.4.2 Proteinkonstruktion

Proteinkonstruktion (protein engineering) ist die Modifizierung oder Neusynthese von proteinkodierenden Genen mit biochemischen *in-vitro*-Methoden. Aminosäuresequenz und Konformation eines Proteins können durch Löschen (Deletion), Einschieben (Insertion) oder Vertauschung (Substitution) einzelner Aminosäuren, Subdomänen, Domänen oder, bei Oligomeren, Untereinheiten verändert werden. Dies kann zu Funktionsverlusten oder zu Funktionsgewinnen führen. Da die Sequenzen natürlich vorkommender Proteine in einem langen Evolutionsprozess optimiert worden sind, führen planlose Sequenzveränderungen, wie sie etwa durch Punktmutationen zustandekommen, meist zu einer Verschlechterung der Funktionalität. An der Katalyse direkt oder indirekt beteiligte Aminosäuren eines Enzymmoleküls können in der Regel nicht substituiert werden, ohne dass dessen katalytische Wirksamkeit beschädigt oder zerstört wird. Es gibt zwei methodische Wege, um durch Proteinengineering die Eigenschaften eines Proteins zu optimieren, welches von einer Nutzpflanze gebildet werden und ihre Eigenschaften verbessern soll, das Proteindesign und die gerichtete Evolution.

Beim (rationalen) Proteindesign werden Aminosäuren oder ganze Sequenzabschnitte proteinkodierender Gene durch gezielte, ortsspezifische Mutagenese der DNA ausgetauscht, entfernt oder eingefügt. Als gerichtete Evolution bezeichnet man die Optimierung und Veränderung von Proteinen und Nukleinsäuren mittels biochemischer Mutagenese und nachfolgender Selektion von verbesserten Mutanten. Zur Erzeugung der mutierten Sequenzen benutzt man überwiegend spezielle Varianten der Polymerasekettenreaktion (PCR). Entscheidend für den Erfolg der gerichteten Evolution ist die Identifizierung von verbesserten Mutanten des Proteins. Dieser Ansatz erfordert ein Hochdurchsatz-Screening. Während beim Proteindesign genaue Kenntnis von Struktur und Wirkungsmechanismus des Proteins notwendig sind, erfordert die gerichtete Evolution lediglich eine Selektion der gesuchten Mutanten. Für Eigenschaften, deren molekulare Ursachen noch nicht ausreichend verstanden sind, wie etwa die Temperaturstabilität eines Enzyms, ist sie deshalb das Mittel der Wahl. Die Expression funktionsoptimierter Proteine in Nutzpflanzen hat zahlreiche realisierte und potentielle Anwendungen.

2.4.3 5-Enolpyruvat-3-Phosphatsynthase

5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS) ist ein Enzym des Shikimatsynthesewegs und katalysiert die Verknüpfung von Phosphoenolpyruvat und Shikimat-3-Phosphat zu 5-Enolpyruvyl-3-Shikimatphosphat, einem Vorläufer der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Diese Aminosäuren sind nicht nur wesentliche Bestandteile der Proteine sondern werden zur Synthese vieler anderer von Pflanzen gebildeter aromatischer Verbindungen gebraucht. Die Shikimatsynthese, an der EPSPS beteiligt ist, findet in den Chloroplasten statt. Die pflanzliche EPSPS wird jedoch nicht vom Plastom, sondern vom Nukleom kodiert. Die Aminosäuresequenz beginnt mit einer Transitsequenz, welche das Enzym nach der Synthese an den cytoplasmatischen Ribosomen in die Chloroplasten lenkt. Pflanzliche EPSPS wird durch Glyphosat (N-Phosphonomethyl-Glycin) kompetitiv gehemmt. Die einfache synthetische Verbindung ist der Wirkstoff der Totalherbizide Roundup und Touchdown. Die Blockierung der EPSPS durch glyphosathaltige Herbizide bewirkt den Ausfall zentraler Stoffwechselwege, was schnell zum Absterben der Pflanzen führt. Das Enzym kommt nur bei Pflanzen und Mikroorganismen vor, aber nicht bei Tieren. Diese synthetisieren selbst keine aromatischen Aminosäuren, sondern nehmen diese mit der Nahrung auf. Dies erklärt, warum Glyphosat für Tiere kaum toxisch ist. Diese Eigenschaften machen EPSPS zu einem guten Angriffspunkt für Herbizide.

Die Glyphosatoleranz von NK673-Biotechmais und vielen anderen glyphosatoleranten Biotechpflanzen beruht auf der Expression einer sequenzoptimierten Form der EPSPS des Agrobakterienstamms CP4 (CP4-EPSPS). Das Enzymprotein besteht aus einer einzigen Peptidkette mit 455 Aminosäuren. Die modifizierte Form der CP4-EPSPS hat eine stark verringerte Bindungsfähigkeit (Affinität) für Glyphosat und macht die Pflanze dadurch gegenüber Glyphosat unempfindlich. Die Aminosäuresequenz des optimierten Bakterienenzym beginnt mit der Chloroplastentransitsequenz des EPSPS-Gens von *Arabidopsis thaliana*. Auch die Transitsequenzen anderer

nukleomkodierter Chloroplastenproteine, z. B. diejenigen der chlorophyllbindenden Proteine des Photosyntheseapparates oder die Transitsequenz der kleineren Untereinheit von Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO), des Schlüsselenzyms der CO₂-Fixierung, lassen sich benutzen, um heterologe rekombinierte Proteine in die Chloroplasten zu lenken.

2.4.4 Bt-Toxine

Signalsequenzen dienen lediglich der Zielbestimmung. Sie werden beim Durchtritt durch die Organellenmembran entfernt und verändern die biologischen Funktionen ihres Trägers nicht. Auch letztere lassen sich durch *in-vitro*-Mutagenese oder Proteindesign modifizieren. Wirksamkeit und Selektivität von Bt-Toxinen haben sich auf diese Weise wesentlich verbessern lassen. Cry1Ac und Cry1Fa sind zwei der zahlreichen in Biotechnologien genutzten insektiziden Toxine, die von dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) gebildet werden. Cry1Ac ist ein monomeres Protein mit 579 AS. Die Peptidkette besteht aus 3 Domänen mit annähernd bekannter Funktion. Domäne 1 (Endotoxin_N) besteht aus den AS 1 - 263, Domäne 2 (Endotoxin_M) aus den Aminosäuren 264 - 434 und Domäne 3 (δ-Endotoxin_C) aus den Aminosäuren 435 - 579. Domäne 2 und 3 ermöglichen die Bindung des Toxins an bestimmte Rezeptoren, mit kurzen Seitenketten aus Aminosäuren versehene Zellmembranproteine der Mitteldarmschleimhaut für das Toxin empfindlicher Insekten. Die Bindung ist hochspezifisch und hat maßgebenden Einfluss auf die Wirtsspezifität des Toxins. Domäne 1 ermöglicht die Einbettung des Toxinmoleküls in die Zellmembran. Sie ist von einer Konformationsänderung des Toxins begleitet, worauf sich mehrere eingebettete Toxinmoleküle zu einem Oligomer zusammenschließen und eine Membranpore bilden, welche einen unkontrollierten Ionendurchtritt durch die Membran verursacht. Infolge des gestörten Ionengleichgewichts lösen sich die Zellen auf. Die Mitteldarmschleimhaut geht zugrunde, was zum Tod der Tiere führt.

Cry1Ac und Cry1Fa haben dieselbe, aus drei Domänen aufgebaute Grundstruktur, unterscheiden sich aber deutlich in ihrer Wirtsspezifität. Cry1Ac ist hochwirksam gegen *Heliothis virescens* (Amerikanische Tabakeule), *Helicoverpa zea* (Baumwollkapselbohrer) und *Pectinophora gossypiella* (roter Baumwollkapselbohrer), während *Spodoptera exigua* (Zuckerrübenmotte) und *Spodoptera frugiperda* (dunkelbraune Tabakeule) ziemlich unempfindlich gegen das Toxin sind. Cry1Fa wirkt nur schwach gegen *Helicoverpa zea*, aber gut gegen die drei anderen Schmetterlinge. Durch Kombination von Domänensegmenten verschiedener Bt-Toxine sind chimäre Toxine mit erweitertem Wirtsbereich konstruiert worden. Ersetzt man Domäne 2 und einen kleinen Teil der Domäne 3 des *cry1Ac*-Gens durch die entsprechenden Segmente von *cry2Fa*, so erhält man ein rekombiniertes Toxin (Cry1Ac/Fa), welches gegen alle vier Schmetterlinge gute, für die landwirtschaftliche Praxis ausreichende Wirkung zeigt ([Perlak u. a., 2001](#); [Malvar & Glimer, 2000](#)). Neben Cry1Ac/Fa gibt es eine Reihe weiterer hybrider Bt-Toxine mit erhöhter Wirksamkeit, welche durch Verschmelzung von Domänen oder Subdomänen verschiedener Bt-Toxingene entstanden sind ([Sainsbury u. a., 2012](#)).

Bt-Toxingene können mit Genen oder Genfragmenten anderer Toxine verschmolzen werden. Um den Wirtsbereich von Cry1Ac zu erweitern, haben [Mehlo u. a. \(2005\)](#) Fusionsgene synthetisiert, welche aus Cry1Ac und der den Zucker Galaktose bindenden Domäne von Ricin B bestehen. Ricin ist ein auch für den Menschen äußerst giftiges Protein aus den Samen der Ricinuspflanze (*Ricinus communis*). Das Ricinmolekül besteht aus einer giftigen A- und einer nicht giftigen B-Kette. Die B-Kette ermöglicht dem Molekül die Bindung an die Zelloberfläche und unterstützt dadurch das Eindringen der A-Kette in das Zellplasma, wo diese die Proteinsynthese blockiert. Obwohl die B-Kette des Ricins für sich genommen nicht giftig ist, sind transgene Maispflanzen, die das Fusionsgen exprimieren, nicht nur wesentlich toxischer für die Zielinsekten als gewöhnlicher Bt-Mais, sondern auch resistent gegen weitere Schadinsekten, die von dem Cry1Ac-Toxin nicht angegriffen werden ([Rang u. a., 2004](#)).

2.4.5 Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

Bei den Landpflanzen kennt man zwei Stoffwechseltypen, welche sich hinsichtlich ihrer primären CO₂-Fixierung unterscheiden. Die einfachere ursprünglichere Form der CO₂-Fixierung findet man bei den C₃-Pflanzen, zu denen viele Kulturpflanzen und die meisten Holzgewächse gehören. Bei den C₃-Pflanzen wird das durch die Spaltöffnungen in die Blätter diffundierende CO₂ in den Chloroplasten durch Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO) auf Ribulosebisphosphat, einen Zucker mit 5 C-Atomen, übertragen. Es entsteht kurzzeitig ein C₆-Körper, der aber schnell in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat zerfällt. Ein Teil davon wird zur Synthese von Glucose und Kohlenhydraten weiterverwendet. Ein anderer Teil dient der

Rückbildung von Ribulosebisphosphat im Calvinzyklus, einer Kette von Enzymreaktionen, an der mehrere weitere Zucker mit 3-7 C-Atomen beteiligt sind. Die katalytische Wirksamkeit von RUBISCO ist gering. Man drückt die Wirksamkeit von Enzymen durch die Wechselzahl aus, das ist die Zahl pro Sekunde von einem Enzymmolekül unter optimalen Reaktionsbedingungen umgesetzter Substratmoleküle. Bei RUBISCO beträgt die Wechselzahl *in vitro* 17/s und in der Zelle 3/s, was für ein Enzym recht wenig ist. Manche Enzyme haben Wechselzahlen von 10'000 und mehr. Zudem ist die Spezifität von RUBISCO für CO₂ begrenzt. Das Enzym bindet neben CO₂ auch Sauerstoff und überträgt diesen auf Ribulosebisphosphat, besitzt also eine Oxygenaseaktivität. Bei der Oxygenierung zerfällt Ribulosebisphosphat in ein Molekül 3-Phosphoglycerat und ein Molekül 2-Phosphoglycolat, das nicht mehr im Calvinzyklus verwendet werden kann und in höheren Konzentrationen toxisch ist. Die Oxygenierungsreaktion ist der erste Schritt der Lichtatmung (Photorespiration). Sie ist ein Stoffwechselweg, der 2-Phosphoglycolat durch eine Reihe von Reaktionen in 3-Phosphoglycerat überführt, welches wieder in den Calvinzyklus eingeschleust werden kann. Für die Pflanze ist die Lichtatmung ein verlustreicher Prozess, da sie einen Teil des assimilierten Kohlendioxids wieder freisetzt und gleichzeitig einen Teil der bei den photosynthetischen Lichtreaktionen gespeicherten Lichtenergie verbraucht. Man schätzt, dass der Kohlenstoffgewinn im Calvinzyklus ohne Photorespiration um etwa 30 % höher sein könnte. Durch hohe Temperaturen wird die Lichtatmung begünstigt, weil erstere das Konzentrationsverhältnis im Zellplasma gelösten Sauerstoffs und Kohlendioxids zugunsten des Sauerstoffs und damit der Oxygenierung verschieben. Beim Reis und anderen an warmes Klima angepassten C₃-Pflanzen fällt die Lichtatmung deshalb stärker ins Gewicht als bei C₃-Pflanzen kühlerer Klimazonen. Da Reis Grundnahrungsmittel für mehr als 2 Mrd. Menschen ist, hätten bereits geringe Verbesserungen der CO₂-Assimilation enorme Bedeutung.

Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, um die geringe CO₂-Affinität von RUBISCO auszugleichen. In Landpflanzen entstand der C₄- und CAM-Stoffwechsel. Zu C₄-Pflanzen zählen Zuckerrohr, Sorghum, Mais und viele Unkräuter, welche an heißen Standorten anzutreffen sind. Den CAM-Stoffwechsel (crassulaceen acid metabolism) findet man u. a. bei Crassulaceen (Dickblattgewächsen), wo er zuerst entdeckt wurde. Beiden Stoffwechseltypen liegt eine ATP-getriebene CO₂-Pumpe zugrunde, mit der sie die CO₂-Konzentration im Gewebe aktiv erhöhen, RUBISCO mit Kohlendioxid sättigen und so die Lichtatmung zurückdrängen. C₄-Pflanzen können die Photosynthese noch bei CO₂-Konzentrationen in Gang halten, bei denen C₃-Pflanzen verhungern müssen. Der untere Kompensationspunkt der Photosynthese, bei dem sich der CO₂-Verbrauch durch Photosynthese und die CO₂-Produktion durch Atmung die Waage halten, liegt bei manchen C₄-Pflanzen bei 5 µl/l, bei C₃-Pflanzen bei 50 µl/l. Die wirksamere Form der CO₂-Fixierung ermöglicht den C₄-Pflanzen außerdem ein weitaus rascheres Wachstum bei hohen Lichtintensitäten und warmen Temperaturen, da die CO₂-Konzentration nie zum begrenzenden Faktor der Photosynthese wird.

RUBISCO ist ein sehr altes Enzym, dessen Entwicklungsgeschichte vor mehr als 3 Mrd. Jahren in sauerstofffreier kohlendioxidreicher Atmosphäre begann. Es ist ein großes heteromeres Molekül, welches aus 8 kleinen und 8 großen Untereinheiten besteht (Abb. 26). Die große Untereinheit, RbcL (Large) wird vom Plastom kodiert, die kleinere, rbcS (Small) vom Nukleom. Pflanzen besitzen mehrere rbcS-Gene, welche unterschiedlich stark exprimiert werden. Reis hat 5 RbcS-Gene und 1 RbcL-Gen. Erstere beginnen alle mit einer Transitsequenz, welche dafür sorgt, dass das rbcS-Molekül nach der Synthese an den cytoplasmatischen Ribosomen in die Chloroplasten transportiert wird. Dort werden 8 kleine und 8 große Untereinheiten unter Mitwirkung von Hilfsproteinen (Chaperonen) zu einem großen heteromeren Molekülkomplex assembliert. Die Funktion der kleineren Untereinheiten im fertigen hexadekameren RUBISCO-Molekül ist unklar, da die meisten katalytisch wichtigen AS in der großen Untereinheit liegen. Es sind viele Versuche unternommen worden, um die enzymkinetischen Eigenschaften von RUBISCO zu verbessern ([Whitney u. a., 2011](#)). Meist konzentrierte man sich dabei auf die Unterdrückung der Lichtatmung durch Steigerung der CO₂-Spezifität. Manche Algen besitzen für CO₂ spezifischere RUBISCOs als Pflanzen. Diese Algenenzyme können aber nicht in pflanzlichen Chloroplasten produziert werden, weil sie andere Bedingungen für die korrekte 3D-Faltung und Assemblierung der Untereinheiten benötigen. Anfangserfolge erzielte man dagegen bei der Steigerung der katalytischen Wirksamkeit. Die Wechselzahlen der RUBISCOs verschiedener Pflanzengruppen können sich deutlich unterscheiden. C₄-Pflanzen und C₃-Pflanzen gemäßigter Zonen haben höhere Wechselzahlen als C₃-Pflanzen warmer Klimaregionen. Die RUBISCO der Hirse (*Sorghum bicolor*), einer C₄-Pflanze, ist effizienter als die des Reis und hat eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz. Wie der Reis besitzt auch die Hirse mehrere RbcS-Gene, die unterschiedlich stark exprimiert werden. Das in Hirseblättern am stärksten exprimierte RbcS-Gen ist unter Kontrolle eines licht- und mesophyllspezifischen Promoters im Reis exprimiert worden. Anscheinend sind die RbcS-Monomeren der Hirse mit Reis-RUBISCO kompatibel und werden im Reischloroplasten korrekt

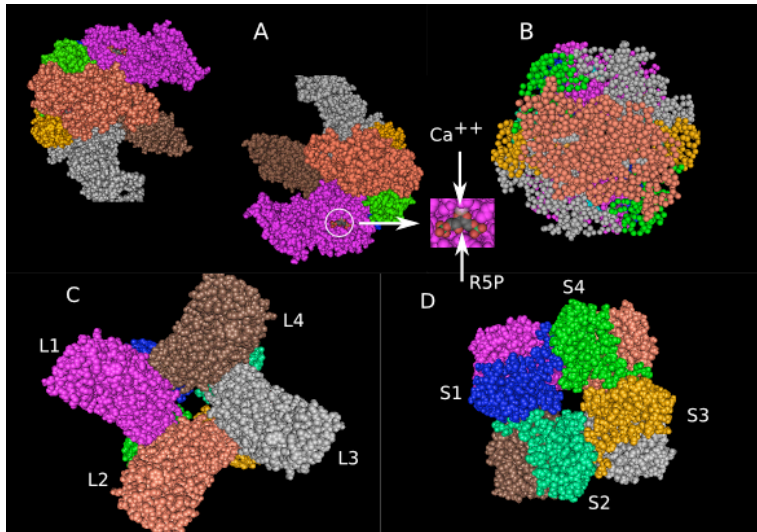


Abb. 26. Molekülgrafik von Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase (RUBISCO) des Spinats. RUBISCO-Enzyme bestehen aus zwei identischen oktameren Halbmolekülen (A), welche aus 4 jeweils identischen kleinen (S1,...S4) und großen (L1,...L4) Monomeren aufgebaut sind. Die großen Untereinheiten jeder Molekülhälfte greifen ineinander und bilden so den kompakten annähernd kugelförmigen hexadekameren Molekül-komplex (B). Im Reaktionszentrum des Enzyms, das in der großen Untereinheit liegt, befindet sich ein Substratmolekül und ein zur Katalyse notwendiges Calciumion. C Unteransicht, D Draufsicht eines Oktamers. R5P Ribulose-1,5-Bisphosphat ([Taylor & Andersson, 1997](#). Journal of Molecular Biology 265:432. Molecular Modeling Database ([MMDBb, 2015](#)) Protein Data Bank ([PDBb, 2015](#)).

assembliert, wobei ein heteromultimeres RUBISCO-Molekül entsteht. Ein Teil der 8 kleinen Untereinheiten des Moleküls stammt aus der Hirse, der andere aus dem Reis. 30 - 90% des gesamten RUBISCO-Aufkommens entfallen auf die hybriden RUBISCO-Formen. Transgene RbcS der Hirse exprimierende Reislinien haben in ihren Blättern einen um bis zu 24% höheren RUBISCO-Gehalt, und die hybride, aus Reis- und Sorghumkomponenten bestehende RUBISCO-Population ihrer Chloroplasten besitzt, abhängig von der transgenen Reislinie, eine um bis zu 50% höhere Wechselzahl. Die Assimilierungsrate ändert sich jedoch trotz dieser Verbesserung der Carboxylierungskapazität nicht. Man vermutet deshalb, dass die RUBISCO-Optimierung erst dann zu einer Steigerung der CO₂-Fixierung führt, wenn gleichzeitig der Elektronentransport der photosynthetischen Lichtreaktionen verbessert wird. Wenn dies zutrifft, ist der Weg zu photosynthetisch produktiverem Reis noch weit ([Ishikawa u. a., 2011](#)).

2.5 Selektive Genabschaltung durch posttranskriptionelle Genstilllegung

2.5.1 Mechanismus

PTGS (post-transcriptional gene silencing) wurde um 1990 bei Experimenten mit Petunien entdeckt, die mit einem zusätzlichen Gen für das Enzym Chalkonsynthase (CHS) transformiert worden waren. CHS katalysiert einen zentralen Schritt der Anthocyansynthese. Anthocyane sind die blauen, roten oder violetten Farbstoffe, die den Blüten der Petunie und vieler anderer Pflanzen ihre charakteristische Färbung verleihen. Petunien, welche ein CHS-Transgen trugen, hatten weiß gefleckte oder reinweiße Blüten, weil die Expression sowohl des endogenen CHS-Gens als auch die des CHS-Transgens unterdrückt worden war ([Napoli u. a., 1990](#); [van der Krol u. a., 1990](#)). Da die Transkription des endogenen Gens nicht reduziert war, vermutete man, dass die CHS-mRNA durch einen sequenzspezifischen RNA abbauenden Mechanismus selektiv zerstört wurde, was ihre Translation verhinderte. Zahlreiche ähnliche Entdeckungen in pflanzlichen und tierischen Systemen zeigten in den folgenden Jahren, dass die RNA-vermittelte Genstilllegung (RNA-Interferenz) ein weit verbreiteter Genregulationsmechanismus ist, der es Organismen erlaubt, bestimmte Gene selektiv abzuschalten, ohne gleichzeitig die Expression anderer Gene zu beeinflussen. Zentrales Funktionselement der posttranskriptionellen Genstilllegung ist doppelsträngige RNA (dsRNA), welche durch einen Dicer genannten Enzymkomplex in kurze RNA-Moleküle, die siRNAs (short interfering RNAs) zerlegt wird. Diese zunächst ebenfalls doppelsträngigen siRNAs werden in ihre Einzelstränge zerlegt, welche dann zu integralen Bestandteilen eines RISC (RNA induced silencing complex) genannten Ribonukleasekomplexes werden. Nach Aufnahme einer siRNA vermag dieser durch komplementäre Basenpaarung die abzubauen RNA zu binden und zerlegt sie dann in ihre Nukleotidbausteine. Die Ziel-RNA des Dicer-Komplexes ist die mRNA des Transgens und des endogenen CHS-Gens.

Die doppelsträngige RNA, deren Spaltung die kurzen siRNAs liefert, wird von einer RNA-Polymerase synthetisiert, welche das RNA-Transkript des Transgens als Matrize benutzt. Bis heute ist unklar, wie diese RNA-Polymerase das Transgen als fremd erkennt und selektiv zu transkribieren vermag. Die kodierende Sequenz des Transgens kann dabei nicht entscheidend sein, da sie mit derjenigen des endogenen Gens identisch ist. Außerdem führt die Transformation mit einem endogenen Gen weder bei der Sojabohne noch bei anderen Pflanzen automatisch zur Auslösung des PTGS-Mechanismus. So sind Sojalinien bekannt, die nach Transformation mit dem eigenen $\delta(12)$ -Fettsäuredehydrogenasegen eine Überexpression der Fettsäuredehydrogenase zeigen ([CERA, 2015](#)). In diesen Linien bewirkt die Überexpression der Desaturase erwartungsgemäß eine Abnahme der Ölsäurekonzentration im Samen. Mit rund 4% ist diese allerdings gering. Als Auslöser der PTGS-Initiierung kommen bisher nicht identifizierte Sequenzmotive in der nicht kodierenden 3'- oder 5'-Region des Transgenkonstrukts, die Orientierung des Transgens im Genom oder Positionseffekte wie der Einfluss von Pflanzenpromotern, die in der Nähe des Integrationsorts liegen und die Transkription des Transgens beeinflussen, in Betracht. Neben diesen statischen Einflussgrößen könnten auch dynamische Effekte als Auslöser der Genstilllegung wirken wie die erhöhte Gleichgewichtskonzentration der CHS- bzw. Fettsäuredehydrogenase-mRNA, die durch die gleichzeitige Transkription zweier Genkopien hervorgerufen wird ([Kanazawa u. a., 2007](#)).

Eine relativ zuverlässige Auslösung des PTGS-Mechanismus gelingt, wenn Pflanzen mit einem Genkonstrukt transformiert werden, das aus einem Promoter und zwei identischen Genen besteht, die gegensinnig orientiert und durch ein Intron getrennt sind (Abb. 27). Die Transkription der von ihrem gemeinsamen Promoter gesteuerten Gene liefert eine partiell doppelsträngige RNA mit einer Haarnadelstruktur (hairpin RNA, hpRNA). Diese dient dann dem Dicerkomplex als Substrat. Diese Technik wird heute am häufigsten zur selektiven Abschaltung von Pflanzengen angewandt (Tab. 11). Zur agrolistischen Transformation von Pflanzen mit RNAi-Haarnadelkonstrukten gibt es zahlreiche Gateway-Vektoren ([Muranaka, 2011](#)). Ein für RNAi-Analysen bestimmter Destinationsvektor hat die allgemeine Kassettenstruktur

Promoter-*attR1*-*ccdB*-*attR2*-Linker-*attR2*-*ccdB*-*attR1*-Terminator.

Durch eine LR-Reaktion mit einem *attL1*-Trigger-*attL2*-Eingangsklon wird die Triggersequenz in beide *att*-Stellen in invertierter Orientierung eingebaut, was ein

Promoter-*attB1*-Trigger-*attB2*-linker-*attB2*-Triggerkomplement-*attB1*-Terminator-

Konstrukt liefert. Die Triggersequenz ist eine Subsequenz des stillzulegenden Gens. Wenn sie in Pflanzen eingeführt wird, wird eine RNA mit einer Haarnadelstruktur exprimiert und zu kleinen einzelsträngigen RNAi-Molekülen verarbeitet, welche mit komplementären Abschnitten der RNA des Zielgens kurze Doppel-

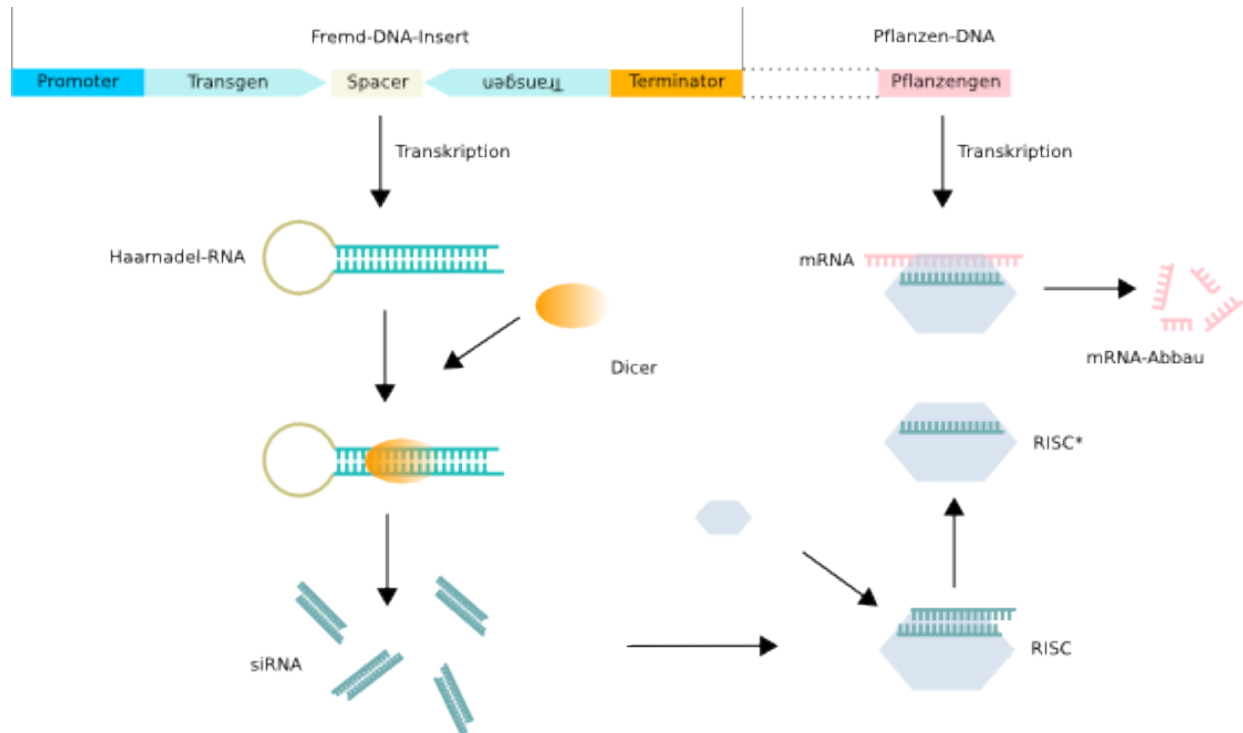


Abb. 27. Posttranskriptionelle Stilllegung eines Pflanzengens in einer mit einem Haarnadelkonstrukt transformierten Pflanze. Die Pflanze trägt eine Expressionskassette mit zwei gegenseitig angeordneten durch ein Zwischenstück getrennten Kopien des stillzulegenden Pflanzengens. Die Transkription der Kassette liefert eine selbstkomplementäre RNA, welche durch Paarung der beiden komplementären Transgensequenzen partiell doppelsträngig wird. Der Dicerkomplex erkennt den RNA-Doppelstrang und zerlegt ihn in kurze regulatorische dsRNA-Moleküle (siRNAs). Diese werden in den RISC-Komplex eingebunden, welcher den Sinnstrang des doppelsträngigen siRNA-Moleküls abbaut und dabei in den aktivierten Zustand (RISC*) übergeht. RISC* erkennt das Komplementärsegment der mRNA des Pflanzengens und geht mit diesem eine sequenzspezifische Bindung ein. Die mRNA des Pflanzengens wird hierauf gespalten und dann abgebaut.

strangbereiche bilden können. Die RNA des Zielgens wird so für den Abbau markiert und dann durch den PTGS-Mechanismus abgebaut.

Mit der RNAi-Technik können in einem einzigen Transformationsschritt mehrere Gene gleichzeitig ausgeschaltet werden, wie die geglückte Modifizierung der Opiumsynthese des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) zeigt. In diesem Fall wurde ein hpRNA-Konstrukt verwendet, welches Sequenzen mehrerer cDNAs aus dem Opiumsyntheseweg enthält. Dies führt zur Akkumulation eines nicht narkotisch wirkenden biochemischen Vorläufers der Opiumalkaloide, des S-Retikulins. Die Akkumulation geschieht auf Kosten von Morphin, Kodein, Opium und Thebain in transgenen Pflanzen. Dies ist das erste Beispiel der simultanen Veränderung mehrerer enzymatischer Syntheseschritte in einem komplexen biochemischen Syntheseweg (Mansoor u. a., 2006).

PTGS wird nicht nur durch Transgene ausgelöst. Auch in die Zelle eingedrungene virale RNA kann durch PTGS als fremd erkannt und abgebaut werden. PTGS wird deshalb als ein phylogenetisch alter biochemischer Mechanismus angesehen, mit dem sich Pflanzen gegen Virusinfektionen schützen können. Auch innere,

Merkmal	Zielgen	Pflanzenart	Nutzwert
Verbräunung	Polyphenyloxidasegen	Kartoffel	verbesserte Lagerfähigkeit
verringertes Koffeingehalt	<i>caMxMt1</i>	Kaffee	koffeinarmer Kaffee
erhöhter Carotinoid- und Flavonoidgehalt	<i>det1</i>	Tomate	gesundheitsfördernd
Maisstärkezusammensetzung	Verzweigungsenzym der Stärkesynthese	Mais	verbesserte Maismehlqualität
Allergenwirkung	<i>lol p1, lol p2</i>	Weidelgras (<i>Lolium spec.</i>)	nicht allergenes Weidegras
vermehrte Arsenaufnahme	<i>acr2</i>	Arabidopsis	Bodenentgiftung
Tab. 11. Beispiele durch RNA-Interferenz bewirkter Stoffwechselmodifizierungen bei Pflanzen (Mansoor u. a., 2006).			

entwicklungsbedingte Faktoren oder bestimmte Umweltreize können die Stilllegung pflanzeigener Gene auslösen ([Herr & Baulcombe, 2004](#)). Bei der Sojabohne kennt man einen natürlichen inneren PTGS-Mechanismus, der alle 9 CHS-Gene, welche die Pflanze besitzt, stilllegen und dadurch die Synthese von Anthocyanen und anderen Flavonoiden dauerhaft blockieren kann. Zwei dominante Allele I, Iⁱ (Inhibitor) des I-Locus (Locus = Genort) des 8. Chromosoms des Sojagenoms hemmen die Samenpigmentierung, was einen farblosen oder schwach gelben Samen ergibt. Nur der Hilus (Nabel), mit dem der Same über den Funiculus (Stil) an der Innenwand der Hülse ansetzt, ist pigmentiert. Das homologe rezessive i-Allel erlaubt die volle Pigmentierung der Epidermis der Samenschale. Die CHS-Gene werden nur in der Epidermis der Samenschale stillgelegt. In allen anderen Geweben und Organen der Pflanze sind Expression der CHS-Gene und Flavonoidsynthese nicht beeinträchtigt. Die meisten Sojakultivare sind rezessiv für I-Allele und haben unpigmentierte gelbliche Samen. Sie wurden von den Sojazüchtern ausgewählt, weil die schwarzbraunen Anthocyane die Protein- und Ölextraktion aus den Samen erschweren.

Die beiden dominanten Allele des I-Locus bilden eine 27 kb lange Genregion, die zwei identische jeweils 6 kb lange gegenseitig orientierte Gruppen dreier CHS-Gene (1, 3, 4) enthält. Zwischen den beiden Gruppen liegt eine 6 kb lange Zwischensequenz. Die restlichen 6 CHS-Gene (2, 5,...9) liegen auf anderen Chromosomen. Wird der I-Locus transkribiert, was vermutlich nur in der Samenschale der Fall ist, entsteht ein langes RNA-Molekül, welches durch komplementäre Basenpaarung der beiden invertierten CHS-Regionen eine doppelsträngige Haarnadelstruktur bildet. Diese wird zum Substrat des Dicerkomplexes, von dem sie in kurze 20 - 30 Nukleotide lange primäre siRNAs gespalten wird. Im nächsten Schritt werden diese von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase vervielfältigt, und die entstandenen sekundären siRNAs paaren sich dann mit sequenzkomplementären Abschnitten aller CHS-Transkripte. Im letzten Schritt der Stilllegung werden diese durch Dicer an den von den siRNAs besetzten Stellen gespalten und anschließend abgebaut. Die beiden invertierten CHS-Genregionen der rezessiven Allele des I-Locus tragen aus Deletionen und Verstümmelungen bestehende Mutationen. Sie werden wahrscheinlich transkribiert. Die gebildete RNA kann jedoch keine Haarnadelstruktur bilden, da die Sequenzen der beiden CHS-Dreiergruppen nicht mehr identisch sind. Der Dicer-Enzymkomplex findet kein Substrat, und so können keine siRNAs gebildet werden. Das CHS-Silencing der dominanten I-Genotypen der Soja ist das natürliche Gegenstück der von [Napoli u. a. \(1990\)](#) entdeckten Kosuppression. Endogenes PTGS-Silencing kennt man auch von einigen anderen Pflanzen. Das CHS-Silencing der Sojabohne unterscheidet sich von diesen Fällen jedoch durch die Gewebespezifität ([Tuteja u. a., 2009](#)). Neben der molekularen Natur der Auslösemechanismen gibt es noch andere Aspekte, die einer endgültigen Klärung harren wie die Stabilität des stillgelegten Genzustandes in den Folgegenerationen und die Frage, ob die Stilllegung vollständig oder nur partiell genspezifisch ist. Letzterenfalls könnten auch Nichtzielgene beeinflusst werden.

Die transgenen Petunien mit ihren stillgelegten Chalkonsynthasegenen und den weißen und gefleckten Blüten haben seinerzeit nicht nur in der Fachwelt Interesse gefunden. Antigentechnikkampagnen der 90er Jahre griffen die Transformationsversuche auf und werteten ihr unerwartetes Ergebnis als schlagenden Beweis für die Gefährlichkeit der Agro Gentechnik und die Existenz mit ihrer Anwendung verbundener unbekannter und nicht beherrschbarer Umwelt- und Gesundheitsrisiken. In den Naturwissenschaften ist es nicht ungewöhnlich, dass ein Experiment die ihm zugrundegelegte Hypothese nicht bestätigt. Oft stimuliert dies intensive theoretische und experimentelle Bemühungen, die Ursachen der nicht erwarteten Resultate zu verstehen. Die bald nach Bekanntwerden der ersten Beispiele in vielen Laboratorien der Welt einsetzende intensive Erforschung der RNA-Interferenz-Phänomene hat wenig mehr als 10 Jahre nach ihrer Entdeckung wesentliche Erkenntnisse über die Steuerung der pflanzlichen Genexpression, der pflanzlichen Individualentwicklung und der Pathogenabwehr geliefert. Gleichzeitig wurden die auf diesem Prinzip aufbauenden Methoden zu einem der wichtigsten Werkzeuge der modernen Pflanzenzüchtung für die Ausstattung von Kulturpflanzen mit neuen Merkmalen.

2.5.2 PTGS-vermittelte transgene Virusresistenzen

Bei mehreren Kulturpflanzen, darunter Kartoffel, Gurke und Papaya, hat die Expression viraler Gene, welche Proteine der Virushülle oder virale Replikationsenzyme kodieren, bereits zur Entwicklung kommerziell nutzbarer hochresistenter transgener Sorten geführt ([CERA, 2015](#)). Auch bei der Zuckerrübe zeigten schon frühe Gewächshaus- und Feldversuche, dass transgene Pflanzen, welche das Hüllprotein des BNYV-Virus exprimieren, reduzierte Viruspegel haben ([Mannerlöf u. a., 1996](#)). [Lennefors u. a. \(2006\)](#) transformierten Zuckerrüben mit einer invertierten 0,4 kb langen Sequenzwiederholung aus dem BNYVV-Replikasegen. Pflanzen, welche dieses Transgen exprimierten, zeigten im Gewächshaus und ebenso im Feldversuch nach Kontakt mit A-, B- und P-Typ-Virusstämmen gleich hohe oder niedrigere Viruspegel als konventionelle resistente Kontrollpflanzen. In infizierten Rüben löst die RNA des Transgens den PTGS-Abwehrmechanismus aus, welcher den Abbau viraler RNA bewirkt und so den Vermehrungszyklus des Virus unterbricht. Die transgene Resistenz gegen BNYVV bleibt erhalten, wenn die Versuchspflanzen mit mehreren Viren gleichzeitig infiziert werden. Dies ist insofern bedeutsam, als manche Rübenviren wie das beet yellow virus die Fähigkeit haben, den PTGS-Verteidigungsmechanismus der Pflanze wirksam zu hemmen. Da die BNYVV-Resistenz durch verbreitet vorkommende Mischinfektionen nicht beeinträchtigt wird, könnte sie sich im Feld als dauerhaft erweisen.

Die Zuckerrübe gehört zu den Pflanzen, bei denen die Regeneration kompletter Individuen aus Zell- oder Gewebekulturen schwierig, zeitraubend und deshalb teuer ist. Um die Möglichkeit des Aufbaus PTGS-vermittelter Virusresistenzen in der Zuckerrübe weiter zu analysieren und die Regeneration dabei umgehen zu können, sind T-DNA-Vektoren entwickelt und in einen geeigneten *Agrobacterium-rhizogenes*-Stamm eingeführt worden, welche auf der T-DNA ein Haarnadelkonstrukt tragen, das aus zwei identischen durch ein Intron getrennten invertiert angeordneten Abschnitten des RNA-Replikasegens des BNYVV-Virus besteht. Die von diesem DNA-Abschnitt transkribierte RNA nimmt eine doppelsträngige Haarnadelstruktur an und wird dadurch zum Substrat des Dicerkomplexes. Damit kommt die PTGS in Gang. Sie führt zum Abbau des viralen RNA-Replikasegens, was den Vermehrungszyklus des Virus unterbricht. Die Ausschaltung der viralen Replikase im Wurzelkörper transformierter Rübenkeimlinge bewirkt eine wesentliche Steigerung der BNYVV-Resistenz. Es werden nur die oberirdischen nicht transformierten Pflanzenteile stark infiziert. Im Wurzelbereich transformierter Keimlinge treten erste Krankheitssymptome 7 - 10 Tage später auf als bei den Kontrollen und 21 Tage nach der Inokulation erweisen sich noch mehr als 80% der Testpflanzen als virusfrei. Der Virustiter der restlichen liegt nur wenig über der Nachweisgrenze des immunologischen Virustests ([Pavli u. a., 2010](#)).

2.6 Entfernung von Selektionsmarkern

Bei den Transformationsprozeduren, die gegenwärtig für Pflanzen verfügbar sind, wird nur ein kleiner Teil der mit der *input*-DNA behandelten Zellen transformiert. Um aus diesen transgene Pflanzen regenerieren zu können, muss man während der Regenerationsphase die nicht transformierten Zellen selektiv am Wachstum hindern. Meist benutzt man dazu Kanamycin oder Hygromycin, da diese Antibiotika nicht nur bei Bakterien, sondern auch bei Pflanzen wirken. Damit die transformierten Zellen nicht ebenfalls durch das dem Kulturmedium zugesetzte Antibiotikum abgetötet werden, baut man in die Input-DNA ein Resistenzmarkergen ein. Dieses kodiert ein Enzym, welches das Antibiotikum chemisch modifiziert und dadurch unwirksam macht. Nach der Regeneration werden die Resistenzmarker meistens nicht mehr gebraucht und sind dann aus verschiedenen Gründen unerwünscht: 1. Die konstitutive Expression eines überflüssigen Enzyms stellt für die Pflanze eine Stoffwechselbelastung dar, die ihren agronomischen Wert mindern kann. 2. Der ausgedehnte Anbau von Biotechpflanzen, die funktionsfähige Antibiotikaresistenz-Markergene tragen, könnte mit zwar geringer, aber endlicher Wahrscheinlichkeit die Selektion resistenter Krankheitserreger begünstigen. Von den Zulassungsbehörden wird deshalb empfohlen, transgene Pflanzen, die Resistenzen gegen Antibiotika tragen, welche noch verordnet werden, ausschließlich zu Versuchszwecken anzubauen. 3. Wenn eine transgene Pflanze zur Einführung eines weiteren Merkmals erneut transformiert werden soll, kann das zur Regeneration verwendete Selektionsmittel nicht mehr eingesetzt werden. Dies ist ein methodischer Nachteil; denn die Auswahl an Selektionsmarkern, die in der pflanzlichen Gewebekultur verwendbar sind, ist recht begrenzt.

Der theoretisch einfachste Weg zur Produktion markerfreier Biotechpflanzen ist es, die Transformationstechnik zu verbessern und die Transformationsfrequenzen so weit zu steigern, dass die Regeneration transgener Individuen auch ohne Verwendung von Selektionsmitteln gelingt ([Huang u. a., 2004](#)). Da dies oft nicht möglich ist, sind verschiedene Verfahren entwickelt worden, mit denen sich Markergene nachträglich aus dem Genom transgener Pflanzen eliminieren lassen. Man kann eine Pflanze gleichzeitig mit zwei verschiedenen Plasmiden transformieren, von denen eines den Selektionsmarker und das andere ein Nutzen trägt. Es lassen sich dann, allerdings mit geringer Wahrscheinlichkeit, Transformanten regenerieren, die beide Gene tragen. Da die Fremdgene unabhängig voneinander ins Pflanzengenom integriert werden, kommen sie gewöhnlich auf verschiedene Chromosomen zu liegen. Sie können dann in der Nachkommenschaft der primären Transformanten segregieren. Der Selektionsmarker lässt sich in diesem Fall durch klassische Kreuzungen entfernen. Es sind ferner auf viralen DNA-Rekombinationssystemen fußende Verfahren entwickelt worden, mit denen sich die in der Agrolistik und Biolistik gebräuchlichen Selektionsmarker nachträglich aus dem Genom transgener Pflanzen eliminieren lassen. Dies ist sowohl bei kerntransformierten als auch bei plasmidtransformierten Pflanzen möglich. Ein bereits kommerziell genutztes Verfahren zur nachträglichen Entfernung zellkernkodierter Selektionsmarker benutzt das Cre/*loxP*-Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 und wird bereits zur Produktion markerfreier Biotechmais- und Sojapflanzen eingesetzt.

2.6.1 Virale Rekombinationssysteme

2.6.1.1 Das Cre/*loxP*-Rekombinationssystem

Das Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 ähnelt dem des Bakteriophagen λ (Abb. 16). Eines der Gene (*cre*) von P1 kodiert das sequenzspezifische Rekombinationsenzym Cre („causes recombination“). Es erkennt zwei identische, an den Enden der linearen Phagen-DNA befindliche, jeweils 34 bp lange *loxP* genannte Bindungsstellen. Zwei ähnliche Erkennungssequenzen liegen auf dem Chromosom des Wirtsbakteriums. Zum Ein- oder Ausbau der Phagen-DNA bildet die Cre-Rekombinase einen Enzymkomplex mit den 4 *loxP*-Sequenzen, wobei die *loxP*-Bindungsstellen der Phagen-DNA mit denen des Bakteriengenoms eine sequenzspezifische Basenpaarung eingehen. Cre benötigt zur Katalyse der DNA-Rekombination nur die *loxP*-Sequenzen und ist auch in eukaryontischen Zellen wirksam. Einfache sequenzspezifische Rekombinationssysteme sind bei Viren, Prokaryonten und niederen Eukaryonten verbreitet. Sie bestehen aus nur zwei Grundbausteinen: einer Rekombinase und kurzen DNA-Sequenzen, die das Rekombinationsenzym erkennt. Diese beiden Komponenten reichen aus, um präzise definierte Rekombinationsreaktionen in heterologen Systemen ablaufen zu lassen, was eine Reihe von Anwendungen zulässt, wie die ortsspezifische Integration von Transgenen, die Verringerung der Zahl der in einem Genom vorhandenen Transgenkopien, die Eliminierung von Markergenen und andere.

2.6.1.2 Das FLP/*frt*-System

Das 2-Mikron-Plasmid von *Saccharomyces cerevisiae* trägt ein Gen (*flp*), welches eine mit Cre funktionsverwandte Rekombinase (FLP) kodiert. Sie erkennt wie CRE zwei kurze identische DNA-Sequenzen (*frt*) und katalysiert die ortsspezifische Rekombination zwischen den beiden Erkennungssequenzen. FLP/*frt* besteht ebenso wie Cre/*loxP* aus nur zwei Komponenten: der Rekombinase und ihren Erkennungssequenzen.

Cre und FLP gehören zur Gruppe der bidirektionalen Tyrosinrekombinasen, welche eine Untergliederung der Proteinsuperfamilie der Rekombinasen bildet. Die reaktive Aminosäure im Reaktionszentrum des Enzym ist Tyrosin. Die Enzyme dieser Gruppe katalysieren die spezifische Sequenzerkennung, Spaltung und Neuverknüpfung von DNA, die ohne Verlust oder Zugewinn von Nukleotiden zur Integration, Deletion oder Inversion eines DNA-Fragments führt. Die Orientierung der Erkennungssequenzen bestimmt die Wirkungsweise. Ihre gleichsinnige Orientierung bewirkt die Exzision, gegensinnige die Inversion des zwischen den Erkennungssequenzen liegenden DNA-Abschnitts. Die Exzisionsreaktion ist reversibel, das Gleichgewicht liegt jedoch stark auf der Seite der Exzision.

Cre/*loxP* und FLP/*frt* funktionieren in Tieren und Pflanzen und können zur nachträglichen Eliminierung der in der Agrolistik und Biolistik gebräuchlichen Selektionsmarker aus dem Nukleom oder Plastom genutzt werden. Zudem ermöglichen sie weitere Anwendungen wie die ortsspezifische Integration von Transgenen oder die Auflösung komplexer Integrationsmuster durch Entfernung überzähliger Transgenkopien. Letztere entstehen durch die zufällige Natur der Transgenintegration, die für die Biolistik und, in geringerem Maße, auch für die Agrolistik typisch ist. Nicht selten führt dies zu einem nicht vorhersagbaren Expressionsverhalten eines Transgens oder zur Genstilllegung und macht die Isolierung transgener Linien mit stabilem Expressionsverhalten zeitaufwendig.

2.6.2 Markerentfernung bei nukleomtransformierten Pflanzen

2.6.2.1 Cre/*loxP*-Exzisionssysteme

Funktionsfähige Cre/*loxP*-Markergenexzisionssysteme müssen folgende Voraussetzungen erfüllen: 1. Die Pflanze muss das *cre*-Gen besitzen. 2. Seine Expression darf erst ausgelöst werden, wenn der nach dem Transformationsexperiment eingeleitete Selektionsprozess abgeschlossen ist und der verwendete Selektionsmarker nicht mehr gebraucht wird. 3. Das Markergen muss zwischen zwei gleichsinnig orientierten *loxP*-Sequenzen eingeschlossen werden, an denen die Cre-Rekombinase angreifen kann. 4. Um späteren unkontrollierbaren Rekombinationsvorgängen vorzubeugen, sollte bei oder nach der Exzision des Markergens auch das *cre*-Gen aus dem Genom entfernt werden. Exzisionsereignisse können bereits im Kallusstadium des Transformationsprozesses sichtbar gemacht werden, wenn in die Expressionskassette, die den Selektionsmarker enthält, zusätzlich ein visueller Marker eingebaut wird. Besonders geeignete viel verwendete Marker für diesen Zweck sind das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) und β -Glucuronidase (GUS). GFP oder GUS exprimierende Zellen lassen sich an ihrer grünen Fluoreszenz bzw. im histochemischen GUS-Test an ihrer Blaufärbung erkennen.

Zur Bereitstellung der Cre-Funktion und ihrer späteren Entfernung gibt es mehrere Möglichkeiten. Bei der Retransformation werden die transgenen Pflanzen, welche den Selektionsmarker tragen, mit einem *cre*-Plasmid nochmals transformiert. In der Folgegeneration kann das *cre*-Gen segregieren. Bei der Kreuzungstechnik werden Pflanzen, welche das *cre*-Gen, nicht aber den zu entfernenden Selektionsmarker besitzen, mit Pflanzen gekreuzt, welche den von zwei *loxP*-Sequenzen flankierten Selektionsmarker tragen. In der ersten Filialgeneration (F₁) dieser Kreuzung findet die Exzision statt, in der zweiten (F₂) segregiert das *cre*-Gen. Bei der Autoexzision (Abb. 28) wird das *cre*-Gen in das zwischen den beiden *lox*-Stellen liegende DNA-Segment eingeschlossen und mit einem induzierbaren Promoter verknüpft. Dieser wird durch ein externes Induktionssignal aktiviert, wenn der Selektionsmarker nicht mehr gebraucht wird. Das *cre*-Gen wird dann zusammen mit dem Selektionsmarker aus dem Genom ausgeschnitten. Wenn ein Hitzeschockpromoter eingesetzt wird, genügt eine vorübergehende Wärmebehandlung (5 h bei 42 °C) von primärem transgenem Kallus für die *cre*-Induktion und die Exzision des *cre*- und Selektionsmarkergens.

Gegenüber den anderen Verfahren zur Bereitstellung der *cre*-Funktion und ihrer späteren Eliminierung hat die Autoexzision einige Vorteile. Sie kann auch bei vegetativ vermehrten Pflanzen wie der Kartoffel angewandt werden oder bei Pflanzen, bei denen Kreuzungen schwierig sind (Soja). Man spart mindestens eine Kreuzungsgeneration und kann den Zeitpunkt der Exzision bestimmen. Neben Hitzeschockpromotern können

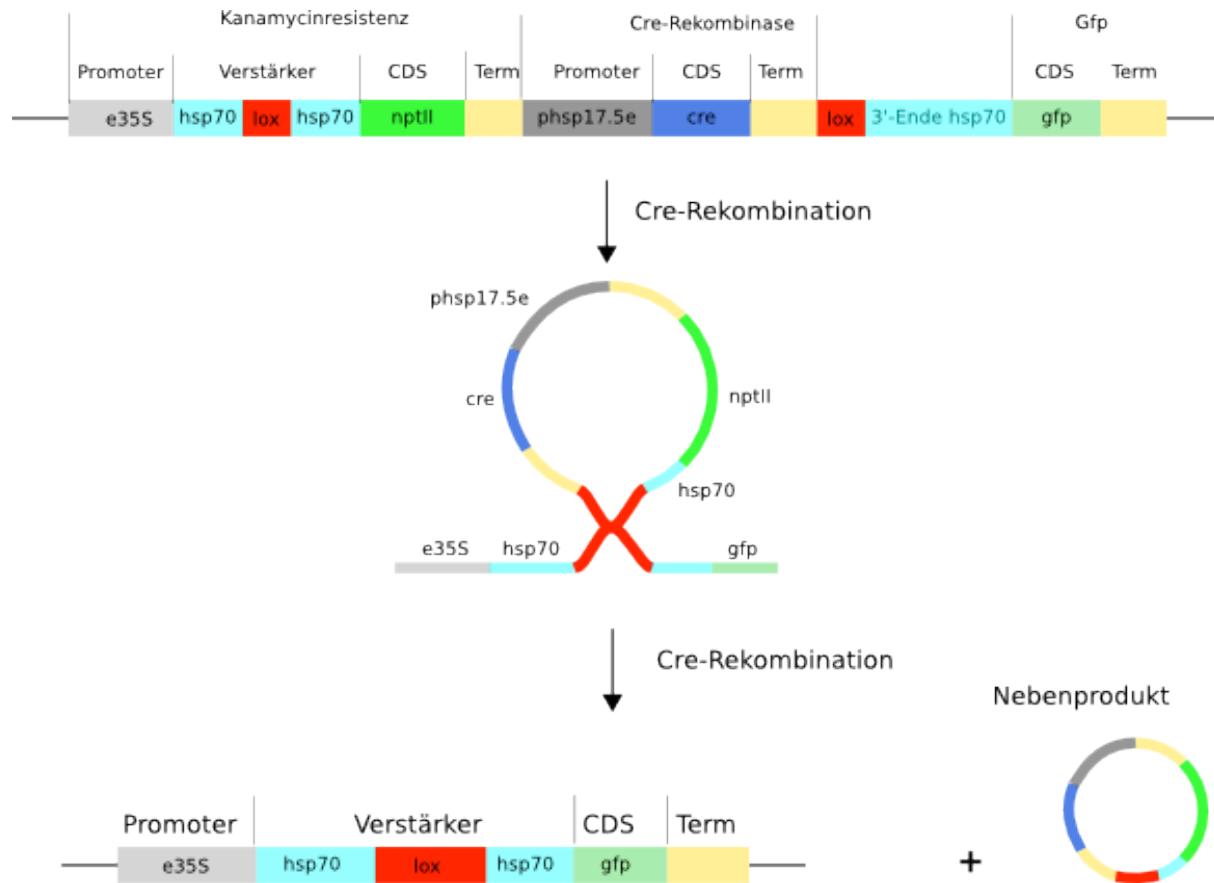


Abb. 28. Autonome cre/lox-Markerexzision beim Mais. Mais wird agrolistisch mit einer Expressionskassette transformiert, welche 3 Transgene trägt: 1. nptII. Das Genprodukt, Neomycinphosphotransferase verleiht Resistenz gegen die Antibiotika Neomycin und Kanamycin. Sein Promoter, e35S, ist ein verbesserter CaMV35S-Promoter. hsp70 ist das erste Intron eines Hitzeschockproteins (hsp70) des Mais. Es wirkt als Expressionsverstärker. lox ist die Erkennungssequenz des Cre/loxP-Rekombinationssystems. CDS kodierende Sequenz, Term Transkriptionsterminator. 2. cre, kodiert die Cre/lox-Rekombinase. Der Promoter des cre-Gens, phsp17.5e, ist ein wärmeinduzierbarer Hitzeschockpromoter der Sojabohne. 3. gfp, kodiert das Grün Fluoreszierende Protein (Gfp) und ist promoterlos.

Hält man transgenen Kallus 5h bei 42 °C wird der Hitzeschockpromoter aktiv. Die Cre-Rekombinase bewirkt dann die Exzision der zwischen den beiden lox-Sequenzen eingeschlossenen DNA. Das ringförmige Nebenprodukt der Rekombination ist nicht replikationsfähig und geht im Verlauf der Gewebekultur verloren. Das promoterlose gfp-Gen wird durch die Exzision unter die Kontrolle des e35S-Promoter gestellt und nun konstitutiv im transgenen Kallus und den daraus regenerierten Pflanzen exprimiert. Bei diesen Experimenten sind kanamycinsensitive Gfp exprimierende Maislinien und Nachkommen erhalten worden, in denen der nptII-Selektionsmarker und das cre-Gen nicht mehr nachgewiesen werden können ([Zhang u. a., 2003](#)).

auch chemisch induzierte Promoter eingesetzt werden. Allerdings sollte der verwendete Promoter dicht sein, d. h. die Transkription des cre-Gens im nicht induzierten Zustand vollständig unterdrücken. Ein undichter Promoter kann bewirken, dass der Selektionsmarker vorzeitig ausgeschnitten wird. Die Wirksamkeit der Cre-Rekombinase in Pflanzenzellen wurde erstmals 1990 belegt ([Dale & Ow, 1990](#)). Wenig später ließ sich an transgenen Tabak- und Arabidopsispflanzen zeigen, dass das Cre/loxP-System zum Entfernen von Reporter- und Selektionsmarkergenen verwendet werden kann ([Dale und Ow, 1991](#)). Auf diese Weise gelang es auch, markerfreien transgenen Reis ([Hoa u. a., 2002](#)) und markerfreien Mais ([Zhang u. a., 2005](#)) zu erzeugen. Der erste markerfreie kommerzielle Biotechmais war die lysinangereicherte Maislinie LY038 von Monsanto, die mit dem Kreuzungsverfahren entwickelt und 2006 zum Anbau zugelassen wurde.

Bei den bisher genutzten Systemen sind überwiegend chemisch oder thermisch induzierbare Promoter zur Steuerung der *cre*-Expression verwendet worden, was eine chemische oder thermische Behandlung des transformierten Gewebes mit dem Induktor notwendig macht. Ein an der Sojabohne erprobtes selbstaktivierendes Cre/*loxP*-Genexpressionssystem erfordert diese Zusatzbehandlung nicht (Li u. a., 2007). Transgene Sojapflanzen regeneriert man standardmäßig aus embryogenen Zellkulturen, in welchen man die Bildung somatischer Embryonen auslöst, die man biolistisch transformiert. Transformationsereignisse kann man selektieren, bevor die Embryonen das globuläre Entwicklungsstadium erreichen. Man kennt einen Promoter (*app1*) von *Arabidopsis thaliana*, der in diesem Stadium vorübergehend aktiv wird. *app1* kodiert einen für die weitere Entwicklung des Embryos gebrauchten Transkriptionsfaktor. Wenn man diesen Promoter mit dem *cre*-Gen verknüpft und das Konstrukt in die Sojapflanze einführt, wird das *cre*-Gen aktiv, sobald die Embryonalentwicklung das globuläre Stadium erreicht. Im Genom vorhandene DNA, welche zwischen zwei *loxP*-Sequenzen eingeschlossen ist, wird dann von der *cre*-Rekombinase ausgeschnitten. Man kann das Markergen und das *cre*-Gen auf der Vektor-DNA unmittelbar hintereinander anordnen, am Anfang und am Ende dieses DNA-Segments je eine *loxP*-Sequenz anfügen und den ganzen *loxP*-Bereich dann zwischen einen konstitutiven Pflanzenpromoter und die kodierende Sequenz eines Glyphosatacetyltransferase-Gens einschieben. Markergen und *cre*-Gen werden dann nach Aktivierung des *cre*-Gens und Synthese der Cre-Rekombinase von dieser zusammen ausgeschnitten. Eine der beiden *loxP*-Sequenzen bleibt bei der Cre/*loxP*-DNA-Rekombination im Genom zurück. Durch die Exzision wird der Promoter des Herbizidresistenzgens unmittelbar vor dessen kodierende Sequenz gerückt, worauf dieses transkribiert wird und Glyphosatresistenz verleiht. Der Regenerationsprozeß liefert nun markerfreie glyphosatresistente Sojapflanzen. Ihr Genom enthält keine Fremd-DNA mehr mit Ausnahme der Expressionskassette der Glyphosatacetyltransferase und der kurzen, jetzt funktionslosen *loxP*-Sequenz, die nach der Exzision des *loxP*-Segments im Genom verbleibt. Das Glyphosatacetyltransferase-Gen dient hier nur dazu, die Funktionsfähigkeit des selbstaktivierenden Genexzisionssystems zu demonstrieren und lässt sich durch jedes andere nützliche Gen ersetzen.

Die bei einem Transformationsexperiment transformierten embryonalen Zellen enthalten, wie molekularbiologische Analysen zeigen, im Mittel 2-3 ins Genom integrierte Kopien der Vektor-DNA, was für das biolistische Transformationsverfahren typisch ist. Bei 13% dieser Zellen führt die *cre*-Aktivierung zur vollständigen Exzision des Markergens. Nur diese Zellen liefern im Laufe der Regeneration markerfreie Zelllinien. In den übrigen verläuft die Genexzision nicht quantitativ. Ihr Genom enthält markerfreie und markerhaltige Vektorsequenzen. Die Regeneranten sind zudem bisher überwiegend Chimären, d. h. sie bestehen aus transformierten und nicht transformierten Zelltypen. Die Hauptursachen der unvollständigen Exzision sieht man in einer zu schwachen oder nicht zeitgerechten Expression des *cre*-Gens und darin, dass in den Zellen zu viele Transgenkopien vorhanden sind. Als Ursache der beobachteten Chimärenbildung wird vermutet, dass die Dauer der Hygromycinselektion nicht ausreicht. Das Antibiotikum wird dem Medium zum Zeitpunkt des Partikelbeschusses der Zellkultur zugesetzt und muss ca. 4 Wochen später entfernt werden, wenn die Entwicklung somatischer Embryonen soweit fortgeschritten ist, dass die Aktivierung des *cre*-Gens beginnt. Diese Zeitspanne reicht aus, um Transformationsereignisse zu selektieren, genügt aber möglicherweise nicht, um alle nicht transformierten Zellen abzutöten.

Vermutlich wird sich die Weiterentwicklung des Verfahrens darauf konzentrieren, das Transformationsverfahren zu verbessern, so dass die Zahl der pro Zelle vorhandenen Transgenkopien verringert wird und diese nach Möglichkeit nur eine Kopie der Vektor-DNA enthalten, ferner darauf, das Expressionsprofil des *app1*-Promoters so zu modifizieren, dass man eine später einsetzende, stärkere und länger anhaltende *cre*-Expression bekommt. Verschiedene Sojavarietäten lassen sich auch agrolistisch transformieren. Optimierte Protokolle liefern Transformationsausbeuten von 3-12% (Liu u. a., 2008). Im Gegensatz zur Biolistik integrieren mit *Agrobacterium* transformierte Zellen oft nur eine Transgenkopie. Auch kennt man zahlreiche embryospezifische pflanzliche Promotersequenzen mit unterschiedlichen, teils überlappenden zeitlichen Expressionsprofilen, und schließlich kann das Expressionsverhalten eukaryontischer Promoter durch *in-vitro*-Mutagenese in weiten Grenzen verändert werden. Anwendungsreife selbstaktivierende Genexzisionssysteme zur Produktion markerfreier Biotechsojasorten werden sich deshalb auf mittlere Sicht sehr wahrscheinlich realisieren lassen.

2.6.2.2 FLP/*frt*-Exzisionssysteme

Auch das FLP/*frt*-Rekombinationssystem ist bei Pflanzen zur Entfernung von Selektionsmarkern eingesetzt worden, z. B. beim Reis (Radhakrishnan & Srivastava, 2005). Gemessen an der Wirksamkeit des CRE/*loxP*-Systems konnten damit zunächst nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt werden. Danach konnte seine Effizienz

jedoch soweit gesteigert werden, dass es als gleichwertiger Ersatz für das *Cre/loxP*-System angesehen werden kann. Ein Meilenstein dieser Entwicklung ist die Züchtung von markerfreiem salztolerantem Mais mit guten Toleranzeigenschaften ([Li u. a., 2010](#)). Die Salztoleranz dieser Pflanzen beruht auf der konstitutiven Expression von AtNHX1, eines Na^+/H^+ -Antiporters von *Arabidopsis thaliana*. Diese Transporter sind ubiquitäre, bei Pflanzen in der Zell- und Vakuolenmembran verankerte Membranproteine. Auch diesen markerfreien Mais erhielt man nach dem Kreuzungsverfahren. Die Elternpflanzen waren zwei transgene Linien, die eine sequenzoptimierte FLP-Rekombinase bzw. den AtNHX1-Transporter und ein von zwei *firt*-Erkennungssequenzen eingeschlossenes Acetolactasegen (*als*) exprimierten. Der *als*-Selektionsmarker verleiht Toleranz gegen Chlorsulfuron und Sulfonylharnstoffherbizide. Ca. 41% der F_1 -Nachkommen dieser Kreuzung besaßen und exprimierten nur das Transportergen. Ihre Selbstung lieferte reine Linien, welche mit konventionellen Elite-Maislinien gekreuzt werden konnten und dann salztoleranten ertragsstarken Hybridmais lieferten. *Cre/loxP* und FLP/*firt* lassen sich kombinieren. Beim gleichzeitigen Einsatz beider Rekombinationssysteme ist es mit der Autoexzision theoretisch möglich, in einem einzigen Transformationsschritt von unerwünschten DNA-Sequenzen freie transgene Pflanzen zu erhalten ([Wang & Yau, 2011](#)).

2.6.3 Markerentfernung bei Transplastomikern

2.6.3.1 Autonome homologe Rekombination

Wie man bei der Exzision eines λ -Prophagen aus dem Chromosom eines lysogenen Bakteriums (Abb. 16) sieht, bewirkt ein einzelnes Rekombinationsereignis zwischen zwei gleichsinnig orientierten Sequenzwiederholungen desselben DNA-Moleküls das Ausschneiden der Zwischensequenz und einer der beiden Sequenzverdoppelungen. Dies gilt unabhängig von der Länge der Homologieregion und der Herkunft der Rekombinationsenzyme. Plastiden besitzen ein eigenes Rekombinationssystem, welches genutzt werden kann, um Selektionsmarkergene aus dem Plastom zu entfernen. Am Tabak wurde dies bereits erprobt. Die Exzision ist ein spontaner Prozess. Zur nachträglichen Entfernung eines *aadA*-Selektionsmarkers aus dem Plastom homoplas-tischer Tabaktransplastomiker genügt es, die Spectinomycinselektion einzustellen. Die Exzisionsfrequenz nimmt mit der Länge der Sequenzwiederholung zu. Sie kann während der gesamten Pflanzenentwicklung stattfinden ([Kode u. a., 2006](#)). Die Exzision kann durch Selektionsdruck begünstigt werden, wenn dadurch ein unterbrochenes Herbizidresistenzgen wiederhergestellt wird (Abb. 29). [Dufourmantel u. a. \(2007\)](#) verwendeten hierzu einen modifizierten Vektor, bei dem die Spectinomycinexpressionskassette in ein *hppd*-Gen eingesetzt wird, wodurch dieses unterbrochen und funktionsunfähig wird. Das *hppd*-Gen bewirkt Toleranz gegen das Herbizid Isoxaflutol (IFT). Die Transformation liefert also zunächst spectinomycinresistente, aber herbizidempfindliche Pflanzen. Die Insertion beginnt hinter dem Nukleotid Nr. 579 und endet vor dem Nukleotid Nr. 177 des *hppd*-Gens. Dann folgen die Nukleotide 177-1074 des *hppd*-Gens. Somit sind 403 Nukleotide (579-177+1) des *hppd*-Gens doppelt vorhanden. Sie bilden eine gleichsinnige, durch die *aadA*-Kassette unterbrochene Sequenzwiederholung auf der Vektor-DNA. Mit diesem Plasmid transformierte Plastome tragen somit eine Sequenzduplikation, an der erneut eine homologe Rekombination stattfinden kann, diesmal intramolekular, innerhalb des ringförmigen Plastommoleküls. Wenn dies geschieht, wird die *aadA*-Kassette aus dem Plastom ausgeschnitten, und dadurch wird die intakte Sequenz des *hppd*-Gens wiederhergestellt. Die betreffenden Plastiden werden dadurch herbizidresistent. Auf IFT-haltigen Gewebekulturmedien lassen sich nun herbizidresistente homoplastische Pflanzen regenerieren, die keine *aadA*-Sequenzen mehr enthalten.

2.6.3.2 *Cre/loxP*-Exzision

Das *Cre/loxP*-System des Phagen P1 ist zur Eliminierung plastomischer Antibiotikaresistenzmarker eingesetzt worden. Die *Cre*-Rekombinase muss hierbei in die Plastiden eingeführt werden, was dadurch geschieht, dass Transplastomiker mit einem rekombinierten *cre*-Gen kerntransformiert werden, dessen kodierende Sequenz mit einem Chloroplastentransitpeptid beginnt. Auch eine Einkreuzung des *cre*-Gens ist zu diesem Zweck möglich. Bei dieser Technik sind gegenüber der homologen Rekombination zwei zusätzliche Schritte nötig: zunächst die Einführung und dann die Entfernung der *cre*-Rekombinase ins und aus dem Genom transplastomischer Pflanzen. Das Plastom enthält der Phagen-*loxP*-Sequenz ähnelnde Pseudo-*loxP*-Sequenzen, an denen die *cre*-Rekombinase angreifen kann. Dies kann unerwünschte Rekombinationen und Deletionen im Plastom bewirken. Allerdings scheinen diese verstümmelten Plastome in der Nachkommenschaft verlorenzugehen, wenn *cre* aus dem Plastom entfernt wird.

Mit Ausnahme der Spectinomycinselektion mit dem *aadA*-Gen, die verbreitet zur Plastomtransformation angewandt wird, sind die meisten Selektionssysteme bisher nur vereinzelt eingesetzt worden. Wie die Beispiele zeigen, ist es grundsätzlich möglich, Selektionsmarker nachträglich aus dem Plastom zu entfernen und markerfreie transgene Pflanzen zu produzieren. Von einer routinemäßigen Anwendung zur Produktion transplastomischer Linien wichtiger Ackerpflanzen sind diese Methoden jedoch noch ziemlich weit entfernt ([Day u. a., 2011](#)).

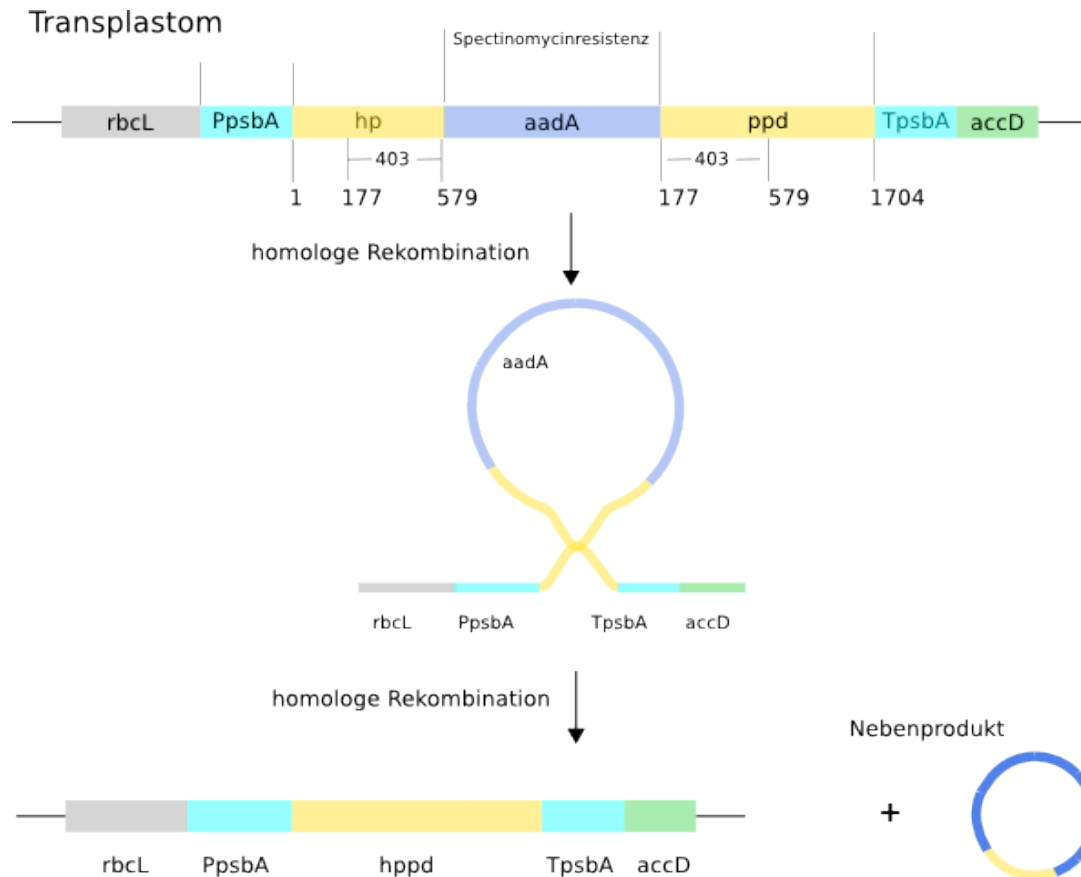


Abb. 29. Eliminierung eines Selektionsmarkers aus dem Tabakplastom durch Wiederherstellung einer Herbizidresistenz. Das Ausgangsmaterial bilden transplastomische spectinomycinresistente Tabakpflanzen. Das Spectinomycinresistenzgen (*aadA*) ist in ein Herbizidresistenzgen (*hppd*) eingesetzt, welches dadurch unterbrochen und funktionsunfähig wird. Eine 403 Nukleotide lange Region des *hppd*-Gens ist doppelt vorhanden und bildet eine gleichsinnig orientierte Sequenzduplikation. Intramolekulare Rekombination innerhalb der Homologieregion bewirkt die Exzision von *aadA* und die Wiederherstellung der *hppd*-Sequenz und der Resistenz gegen Isoxaflutol. Die Expressionskassette mit den Transgenen liegt zwischen dem *rbcL*- und dem *accD*-Gen des Tabakplastoms. Das *hppd*-Gen verwendet die Promoter- und Terminatorregion eines weiteren Chloroplastengens (*psbA*). *aadA* hat eigene Promoter- und Terminatorregionen ([Dufourmantel u. a., 2007](#)).

2.6.3.3 Markereliminierung durch Kotransformation

Schließlich lassen sich markerfreie Transplastomiker wie bei kerntransformierten Pflanzen auch durch Kotransformation mit einem weiteren Selektionsmarker gewinnen, z. B. indem man nacheinander mit *aadA* und einem Herbizidresistenzmarker transformiert und erst mit Spectinomycin und dann mit dem Herbizid selektiert. Bei dieser Nachselektion geht das *aadA*-Gen nach und nach verloren. Nicht selektierbare Transgene lassen sich so allerdings nicht im Plastom unterbringen.

2.7 Genstapelung

2.7.1 Genstapelung durch Kreuzung monotransgener Linien

Die ursprünglich angebauten Biotechpflanzen waren herbizid- oder insektenresistente Sorten, welche nur ein einziges Funktionsgen exprimierten. In den westlichen Anbauländern sind sie heute fast völlig durch mehrfach resistente oligotransgene Stapelsorten verdrängt, die meistens durch sukzessive Mehrfachkreuzungen monotransgener Elternlinien erhalten wurden. Zwar lassen sich auf diesem Weg theoretisch beliebig viele Gene in eine Sorte übertragen, die Züchtungsprogramme werden aber immer aufwendiger. Transgene vererben sich wie endogene Pflanzengene nach den Mendelschen Regeln. In der F₂-Generation einer Kreuzung zweier Elternpflanzen, die verschiedene Resistenzen oder andere Merkmale tragen, spalten diese, sofern sie nicht zufällig eng gekoppelt sind, wieder auf, wodurch sie in einem Teil der Nachkommenschaft teilweise oder ganz verlorengehen. Mithilfe wiederholter Einkreuzungen erhält man deshalb anbaufähige Stapelsorten, die alle gewünschten Merkmale ihrer Ahnen tragen, nur nach Ablauf über mehrere Generationen laufender Züchtungsprogramme. Bei mehr als 4 Merkmalen ist das kaum noch praktikabel.

2.7.2 Multipler Gentransfer

Insbesondere bei den im Hinblick auf medizinische und industrielle Anwendungen interessanten Stoffwechselmodifizierungen genügen Einzelgenübertragungen meist nicht. Pflanzliche Stoffwechselwege sind komplex. Sie können vielfache Verzweigungen haben, multifunktionelle, kompartimentierte oder zellspezifische Enzyme benötigen und durch mehrfache Rückkopplungsschleifen geregelt werden. Ein eleganterer und schnellerer Weg als die konventionelle Kreuzungstechnik ist es, die zur Ausprägung eines gewünschten Phänotyps erforderlichen Transgene in Form eines einzigen DNA-Segments ins Pflanzengenom zu integrieren. Dann erübrigen sich die sonst erforderlichen Mehrfachkreuzungen, und die spätere Einkreuzung der Merkmale in konventionelle Hochleistungssorten ist leichter, da die neuen Gene auf einem einzigen DNA-Segment unmittelbar hintereinander liegen und deshalb in der Regel *en bloc* vererbt werden, so dass die neue Merkmalskombination in allen Nachkommen erhalten bleibt. Zudem verringert sich der Transformationsaufwand. Mit den herkömmlichen Transformationsmethoden gelingt dies nicht, da die Transformation desto schwieriger ist, je länger die zu übertragenden DNA-Abschnitte sind. Sowohl die Biolistik als auch die Agrolistik ist heute so weit verbessert worden, dass mehrere Gene in einem einzigen Transformationsschritt übertragbar sind. [Naqvi u. a. \(2009\)](#) erhielten durch biolistische Transformation von Maisembryonen transgene Maispopulationen, welche im Endosperm erhebliche Mengen der (Pro)-Vitamine β -Carotin, Ascorbinsäure und Folsäure kodieren ([3.7.2.3](#)). In das Genom des Braunen Senfs (*Brassica juncea*) lassen sich gleichzeitig bis zu 9 Transgene einführen, welche unmittelbar hintereinander auf demselben Transformationsplasmid liegen. Sie werden alle im Braunen Senf exprimiert. Dies bewirkt die Umsteuerung des Fettsäurestoffwechsels im Samen und die Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus Linolsäure und Linolensäure ([Wu u. a., 2005](#)). Auch beim Mais, der wie Raps und Senf mit *Agrobacterium* transformierbar ist, sollten agrolistische simultane Mehrfachtransformationen möglich sein und werden dann Eingang in die Sortenentwicklung finden.

2.8 Hybridenzüchtung und männliche Sterilität

Raps zeigt wie Mais den Heterosisseffekt; das heißt, durch Kreuzung reiner Linien erhaltene Bastarde sind ertragsstärker als ihre reinerbigen Elternpflanzen. Die zu Produktionszwecken angebauten Rapsvarietäten sind daher meist Hybriden. Bei der Erzeugung von Hybridsaatgut muss verhindert werden, dass sich die Kreuzungspartner selbst befruchten. Beim Mais ist dies leicht möglich, weil die Blüten eingeschlechtig sind und jede Pflanze nur einen einzigen männlichen Blütenstand an der Stengelspitze ausbildet, den man von Hand entfernen kann. Beim Raps ist die manuelle Entfernung der Staubblätter (Handemaskulation) wegen der Vielzahl kleiner Blüten, die man an jeder Pflanze findet, im Produktionsmaßstab nicht durchführbar. Durch Verwendung eines männlichen Sterilitätssystems kann diese Schwierigkeit umgangen und die Hybridenzüchtung wesentlich erleichtert werden. Konventionelle männliche Sterilitätssysteme bestehen aus einer männlich sterilen Linie MS, deren Blüten keinen lebensfähigen Pollen erzeugen können, und einer Restorerlinie RF (restoration of fertility), welche ein Gen besitzt, das die Fertilität in den Kreuzungsnachkommen beider Linien wiederherzustellen vermag. Eine MS-Pflanze kann sich nicht selbst befruchten. Sie kann aber vom Pollen eines anderen Individuums befruchtet werden. Das Saatgut der ersten Filialgeneration (F_1), welches aus einer Kreuzung zwischen MS und RF hervorgeht, liefert Bastarde, die Pollen bilden und vollständig fruchtbar sind. Nach der Funktionsweise kann man cytoplasmatische und nukleäre männliche Sterilitätssysteme unterscheiden.

2.8.1 Das Barnase/Barstar Sterilitätssystem

Viel Forschungsarbeit ist beim Raps auf die Entwicklung cytoplasmatischer männlicher Sterilitätssysteme (CMS-Systeme) verwandt worden, da sich diese bei anderen Arten bis jetzt als wirksamstes Werkzeug zur Produktion von Hybriden erwiesen haben. Bei der CMS liegt der die männliche Sterilität der Blüten verursachende genetische Defekt der MS-Linie gewöhnlich auf der DNA der cytoplasmatischen Mitochondrien. Es sind mehrere CMS-Systeme für den Raps verfügbar, von denen aber keines vollständig befriedigen kann. Vielfach werden sie durch Störfaktoren wie Instabilität bei wechselnden Klimabedingungen oder partielle weibliche Sterilität der männlich sterilen Pflanzen oder der Restorerlinie für die Praxis unbrauchbar gemacht. Zudem fehlt es an Selektionsmarkern für die zur Reinerhaltung der MS-Linie erforderliche Abtrennung männlich fertiler von männlich sterilen Individuen.

Seit 1995 sind transgene für die Hybridenzüchtung geeignete Canolalinien auf dem Markt, in denen ein gentechnisch erzeugtes nukleäres MS-System, das Barnase/Barstar-Sterilitätssystem, zur Anwendung kommt ([Mariani u. a. 1990](#); [Denis u. a., 1993](#)). Die MS-Linie dieses Systems ist transgen, männlich steril und glufosinatresistent. Die männliche Sterilität wird durch das *barnase*-Transgen hervorgerufen. Es stammt aus *Bacillus amyloliquefaciens*, einem verbreiteten Bodenbakterium, welches vielfach zur Produktion industriell genutzter Enzyme dient. *barnase* kodiert eine Ribonuklease (RNase). Das sind Enzyme, welche Ribonukleinsäuren spalten und in ihre Nukleotidbausteine zerlegen. Viele Bakterien produzieren Nukleasen und schleusen sie durch die Zellwand ins umgebende Medium aus, um dort aus abgestorbenen Organismen stammende Nukleinsäuren zerlegen und ihre Nukleotidbausteine dann als Nahrung aufnehmen zu können. In der MS-Biotechrapslinie wird das Gen nur während der Pollenentwicklung im Tapetum der Pollensäcke exprimiert, da es von einem tapetumspezifischen Promoter gesteuert wird. Das Tapetum ist die innerste Zellschicht der Wand der Pollensäcke. Seine Zellen sichern die Nährstoffversorgung der Pollenkörner während der Pollenentwicklung. Die RNase (Barnase) blockiert die RNA- und Proteinsynthese im Tapetum, was zum Untergang des Tapetums, zum Stillstand der Pollenentwicklung und zur Bildung von Blüten mit sterilen Staubblättern führt. Die RF-Biotechrapslinie ist transgen, glufosinatresistent und Träger des *barstar*-Restorergens, welches in den Hybriden, die aus der Kreuzung einer MF- mit einer RF-Pflanze hervorgehen, die Fertilität wiederherzustellen vermag. Auch *barstar* stammt aus *Bacillus amyloliquefaciens*. *barstar* kodiert das Barstar-Protein (Barstar). Es ist ein RNase-Hemmer (Inhibitor), welcher die für das Bakterium lebensnotwendigen eigenen RNA-Moleküle vor dem Angriff der Barnase schützt. Auch dieses Gen ist mit einem tapetumspezifischen Promoter verknüpft und wird deshalb in der RF-Linie nur während der Pollenentwicklung im Tapetum exprimiert, wo es die von der MS-Linie gebildete Barnase zu inaktivieren vermag. Die beiden Proteine, Barnase und Barstar, bilden zusammen einen sehr stabilen enzymatisch inaktiven Proteinkomplex. Wenn nun die Blüten der männlich sterilen MS-Linie von Pollen der RF-Restorerlinie befruchtet werden, exprimieren die aus der Kreuzung hervorgehenden hybriden Rapspflanzen im Tapetum sowohl die RNase als auch den RNase-Inhibitor. Die Pollenentwicklung läuft normal ab, und die Fertilität ist wiederhergestellt. Beide Biotechrapslinien tragen ein Herbizidresistenzgen, welches dazu dient, in der Gewebekultur transformierte Pflanzenzellen zu identifizieren und zu isolieren, um aus diesen dann

transgene Pflanzen zu regenerieren. Außerdem ermöglicht die Herbizidresistenz die Selektion zu 100% reinen Hybridsaatguts im Feld.

Die beiden Biotechrapslinien ACS-BNØØ4-7 (MS1) und ACS-BNØØ1-4 (RF1) bilden ein für die Hybridenzüchtung geeignetes kommerziell nutzbares männliches Sterilitätssystem, welches auf der gewebespezifisch regulierten Expression von *barnase* (MF1) bzw. *barstar* (RF1) in der Tapetumwandschicht der Pollensäcke beruht. Der Promoter (TA29), von dem die beiden Fusionsgene gesteuert werden, stammt aus dem Tabak. Er wird nur im Tapetum aktiv und zeigt im Raps dasselbe Expressionsverhalten wie in seiner Ursprungspflanze. In der MS-Linie führt dies zum Untergang der Tapetumzellen, dem Stillstand der Pollenentwicklung und der Bildung von äußerlich zwar annähernd normalen, aber sterilen Staubblättern. In den Pollensäcken findet man bloß leere Pollenkörner, die nur aus der äußeren (Exine) und inneren (Intine) Pollenwand bestehen. Sie sind nicht befruchtungsfähig, können aber durch Insekten oder durch den Wind verfrachtet werden. Wenn dies von vornherein verhindert werden soll, muss man das Sterilitätssystem modifizieren. Dies gelingt, indem anstelle des TA29-Promoters entwicklungsregulierte Promoter eingesetzt werden, die schon im Frühstadium der Staubblattentwicklung wirksam werden. *barnase* wird dann so zeitig exprimiert, dass eine normale Antherenentwicklung nicht mehr möglich ist und die Pollenbildung unterbleibt.

An der Blütenentwicklung der Höheren Pflanzen sind mehrere tausend entwicklungsregulierte Gene beteiligt, die großenteils nur in definierten Phasen und Zellschichten der sich entwickelnden Blüte wirksam werden. PsEND1 (*Pisum sativum* ENDOTHECIUM 1) ist ein antherenspezifisches Gen der Erbse (*Pisum sativum*), welches sehr früh in den embryonalen Zellen aktiv wird, aus denen im Laufe der Blütenentwicklung die Staubblätter hervorgehen. Im Tapetum und den übrigen Geweben der reifen Staubblätter ist das Gen bereits wieder abgeschaltet. Der Promoter zeigt in Modellpflanzen wie der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) oder dem Tabak (*Nicotiana tabacum*) und ebenso dem Raps annähernd das gleiche Expressionsverhalten wie in seiner Ursprungspflanze. Wenn man den Raps mit einem Fusionsgen transformiert, das aus dem PsEND1-Promoter und der Barnase-Sequenz besteht, erhält man männlich sterile Pflanzen. Der Promoter arretiert die Staubblattentwicklung schon vor der Differenzierung der Pollenmutterzellen. Antheren und Pollensäcke sind noch erkennbar, aber missgebildet und enthalten keinen Pollen mehr. Die Filamente sind stark verkürzt. Im übrigen unterscheiden sich die Transgeniker nicht von normalen Kontrollpflanzen. Dies gilt insbesondere für die weiblichen Blütenorgane, die vollständig fruchtbar sind und von der transgenen Restorerlinie, welche *barstar* unter Kontrolle des PsEND1-Promoters exprimiert, bestäubt werden können. Das so erhaltene Hybridsaatgut liefert wie beim klassischen Barnase/Barstar-Sterilitätssystem vollständig fruchtbare Pflanzen.

Wenn in Zukunft Biotechrapslinien mit neuen Merkmalen im Feld getestet und als Versuchspflanzen die männlich sterilen PsEND1-Barnase-Linien eingesetzt werden, verbessert dies die Umweltsicherheit. Zwar ist bereits beim klassischen Barnase/Barstar-Sterilitätssystem keine pollenvermittelte Übertragung der Transgene der MS-Linie auf sexuell kompatible Pflanzen möglich. Theoretisch möglich, wenn auch außerordentlich unwahrscheinlich ist es aber, dass der sterile Pollen durch Wind oder Insekten fortgetragen und von Mikroorganismen abgebaut wird, die sich dann intakte Transgene einverleiben. Ein horizontaler Genfluss dieser Art ist bei Verwendung des PsEND1-Promoters von vornherein ausgeschlossen ([Roque u.a. 2007](#)).

2.8.2 Das Barnase/Intein-Sterilitätssystem

2.8.2.1 Inteine

Inteine sind innere Sequenzabschnitte eines Proteins, welche sich selbst aus diesem ausschneiden und die verbleibenden Stücke, die Exteine, wieder durch eine normale Peptidbindung verknüpfen können. Die Exzision des Inteins verändert die beiden Exteinsequenzen nicht. Man kennt hunderte von Inteinen ([InBase, 2015](#)), von denen viele in DNA-Polymerasen, Helikasen und anderen Genen des DNA-Metabolismus vorkommen. Inteine wurden in allen 3 Lebensreichen bei Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryonten gefunden, jedoch nicht bei eukaryontischen Vielzellern. Bei eukaryontischen Einzellern findet man sie auch in den Organellengenomen. Man kennt verschiedene Inteintypen. Das Intein DnaB des Cyanobakteriums *Synechocystis spec.* ([Wu u. a., 1998a](#)), ist eine DNA-Helikase und enthält eine Inteinsequenz mit 429 Aminosäuren. Die Inteinsequenz ist durch einen zentralen Sequenzabschnitt, die Aminosäuren 207 - 381, unterbrochen, welcher eine Endonukleaseaktivität besitzt. Entfernt man diesen Teil der Inteinsequenz, erhält man ein Miniintein mit 154 AS, welches voll funktionsfähig ist und in *E. coli* die Proteinspleißung durchführen kann. Ein weiteres *Synechocystis*-Intein liegt im *dnaE*-Gen, welches die katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase III des Cyanobakteriums kodiert ([Wu u. a., 1998b](#)). Das Gen besteht aus zwei Abschnitten, die in einer Entfernung von mehr als 745 kb auf

gegenüberliegenden DNA-Strängen des Bakteriengenoms liegen. Eine Genhälfte kodiert das N-terminale Extein und die ersten 123 Aminosäuren des Inteins, die andere die letzten 36 Aminosäuren des Inteins und das C-terminale Extein der DNA-Polymerase.

Bei der Expression von *dnaE* assoziieren seine beiden Translationsprodukte zu einem Proteinspleißkomplex, welcher die Inteinhälften freisetzt und die beiden Exteine durch eine Peptidbindung zur reifen DNA-Polymeraseuntereinheit verknüpft. Dies geschieht auch bei der Expression der beiden Genhälften in *E. coli*. Man kann den vor der Endonukleasesequenz liegenden N-terminalen Abschnitt von *dnaB* und den dahinter liegenden C-terminalen Abschnitt in zwei verschiedene Expressionskassetten einbauen und beide Inteingensegmente dann in *E. coli* exprimieren. Es werden dann wie bei der Expression von *dnaE* unabhängig voneinander zwei verschiedene Polypeptide, ein N-terminales und ein C-terminales Inteinbruchstück, gebildet, die zu einem Komplex assoziieren, welcher die Proteinspleißung durchführen kann. Um zu einem funktionsfähigen Spleißkomplex assoziieren zu können, müssen die beiden Inteinhälften also nicht unbedingt kovalent verbunden sein.

Die *DnaE*-Exteinsequenzen können durch beliebige Aminosäuresequenzen ersetzt werden, ohne dass der Spleißvorgang beeinträchtigt wird, wenn nur einige wenige Aminosäuren in der Umgebung der Spleißstelle mit den nativen Exteinsequenzen übereinstimmen. Zudem ist die Inteinspleißung auch *in vitro* durchführbar. Durch diese Eigenschaften wurden die Inteine schon bald nach ihrer Entdeckung zu einem völlig neuen und leistungsfähigen Werkzeug der Proteinkonstruktion *in vitro* und *in vivo*, für das es bereits zahlreiche biotechnische und biomedizinische Anwendungen gibt ([Anraku u. a., 2005](#); [Volkman & Mootz, 2013](#)). Für das Barnase/Inteinhybridsystem, eine Weiterentwicklung des Barnase/Barstarsystems, ist das *DnaB*-Intein von *Synechocystis* von zentraler Bedeutung.

Die mit dem Heterosiseffekt verbundenen Ertragssteigerungen findet man nicht nur bei Mais und Raps, sondern auch bei anderen Nahrungspflanzen wie dem Reis und einheimischen Getreidearten. Weder ist bei diesen Pflanzen eine manuelle Bestäubung im Produktionsmaßstab durchführbar noch gibt es zuverlässige männliche Sterilitätssysteme, welche erstere ersetzen könnten. Das Interesse der Saatgutproduzenten an einer universellen Technik für die Produktion von Hybridsaatgut ist deshalb groß. Das Barnase/Intein-Teilgenhybridisierungssystem (split gene system) könnte diese Lücke schließen. Das System ist von Gils, Kempe u. a. (2008, 2014) entwickelt und an *Arabidopsis* ([Gils u. a., 2008](#)) und Weizen ([Kempe u. a., 2014](#)) erprobt worden. Es ist prinzipiell bei vielen Pflanzen anwendbar. Es kombiniert die tapetumspezifische Barnaseexpression mit der Proteinspleißung und der ortsspezifischen DNA-Rekombination des Bakteriophagen phiC31. Es besteht aus mehreren Teilprozessen. Die Produktion von Hybridweizen nach diesem Prinzip ist in den Abbildungen 30 - 32 ausführlich beschrieben.

2.8.2.2 Produktion von Hybridweizen mit dem Barnase/Intein-System

Zunächst erzeugt man eine transgene Vorläuferlinie, die zwei komplementäre Barnase-Inteinfragmente exprimiert, indem man den Wildtyp biolistisch mit einer Vektor-DNA transformiert, welche im wesentlichen aus zwei Genkassetten besteht. Eine enthält das N-terminale, die andere das komplementäre C-terminale Barnaseinteingenfragment. Der Vektor A (Abb. 30), mit dem die Transformation durchgeführt wird, heißt im Barnase/Inteinsystem Provektor. Das übertragene DNA-Fragment hat die Grundstruktur

$attP_1::P_{tap}::barN-intN::attB::hpt::barC-intC::P_{tap}::attP_2$

attP_{1,2} und *attB* sind die Erkennungssequenzen der Integrase der phiC31-Rekombination. *attP₁* und *attP₂* sind identisch. *barN*, *barC*, *intN*, *intC* sind die N- und C-terminalen Hälften des Barnasegens bzw. des *dnaB*-Miniinteingens von *Synechocystis spec.* *P_{tap}* ist ein tapetumspezifischer Pflanzenpromoter. *hpt* ist ein Hygromycinselektionsmarker. Die Doppelpunkte symbolisieren zwischen den genannten Elementen liegende DNA-Abschnitte. Da jedes Barnase-Inteinfragment seinen eigenen tapetumspezifischen Promoter hat, werden die beiden Teilgene in den Transformanten unabhängig voneinander exprimiert und in zwei nicht kovalent verbundene Polypeptide übersetzt. Im Zellplasma assoziieren diese zu einem Proteinspleißkomplex, welcher die Inteinsequenzen ausschneidet und die Barnasefragmente zum reifen Barnaseenzym verknüpft. Letzteres unterbricht die Pollenentwicklung. Die Transformanten sind deshalb männlich steril, können aber vom Wildtyp bestäubt werden. Sie lassen sich deshalb durch Kreuzung mit dem Wildtyp weiterzüchten, und man kann in den Tochtergenerationen hemizygote Individuen selektieren, welche nur eine Kopie der T-DNA des Provektors

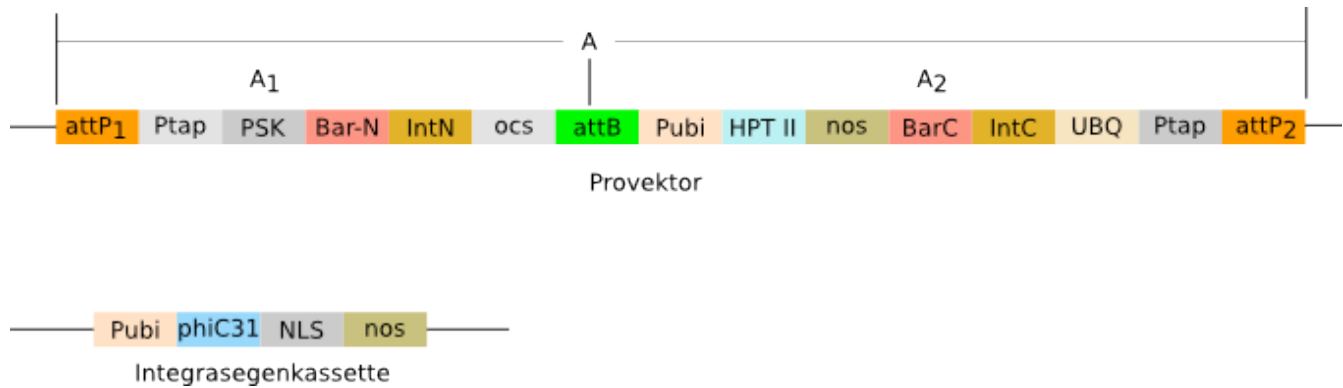


Abb. 30. Struktur der Genkassetten (nicht maßstäblich), die zur Erzeugung der Barnase exprimierenden Vorläuferlinie mit dem A-Prolocus und der Integraselinie verwendet wurden. Der Provektor A trägt attP und attB-Sequenzen, die als Ziele für die ortsspezifische Phagenrekombinase phiC31 dienen. Ptap tapetumspezifischer osg6B-Promoter vom Reis, PSK Intron PSK7-i3 der Petunie (Expressionsverstärker); Bar-N, Bar-C amino- und carboxyterminale Hälfte des Barnasegens von *Bacillus amyloliquefaciens*; IntN, IntC N- und C-terminale Inteinsequenzen des dnaB-Gens des Cyanobakteriums *Synechocystis spec.*; ocs Terminator des Octopinsynthesgens von *Agrobacterium tumefaciens*; attB, attP1, attP2 Erkennungssequenzen der Phagenintegrase; attP1 und attP2 sind identisch. Pubi Mais-Ubiquitin-1-Promoter; HPT II Hygromycinphosphotransferase; nos Nopalinsynthaseterminator (*Agrobacterium tumefaciens*); phiC31 ortsspezifische DNA-Rekombinase des Phagen phiC31; NLS Kerntransportsignalsequenz. Sie bewirkt den Transport der Integrase in den Zellkern (Kempe u. a., 2014).

tragen. Diese haben den Genotyp AA₀ und sind männlich steril. A₀ symbolisiert dabei die leere Insertionsstelle am A-Locus des homologen Wildtypchromosoms.

Im nächsten Schritt kreuzt man eine hemizygoten A-Linie mit einer homozygoten transgenen Linie, welche unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors (P_{ubi}) die Integrase I des Bakteriophagen phiC31 exprimiert. Die Kreuzung ist eine klassische Zweifaktorkreuzung vom Typ AA₀I₀ x A₀A₀II und liefert mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% männlich sterile Nachkommen, die sowohl den Provektor als auch die Integrase besitzen. In der Entwicklung dieser Individuen wird letztere aktiv. Sie erkennt die att-Sequenzen und rekombiniert die Vektor-DNA des A-Locus, wobei entweder das N-terminale oder das C-terminale Barnase-Inteinfragment aus dem Chromosom ausgeschnitten wird (Abb. 31). Rekombination zwischen attB und attP₂ erhält das N-terminale Fragment und liefert den Genotyp A₁A₀. Rekombination zwischen attB und attP₁ erhält das C-terminale und liefert den Genotyp A₂A₀. Da die attB-Stelle nur einmal im Vektor vorhanden ist, sind die beiden Rekombinationsmöglichkeiten alternativ und können nicht beide in derselben Zelle eintreten. Sie sind zudem irreversibel. In einer Bakterienzelle, die den Prophagen phiC31 trägt, vermag die Phagenintegrase die Rückreaktion zu katalysieren, den Phagen aus dem Bakterienchromosom auszuschneiden und so den lytischen Phagenzyklus einzuleiten, benötigt dazu aber Bakterien- und Phagenproteine, welche der Pflanze fehlen.

Da das Ergebnis der Rekombination nicht eindeutig ist und letztere auch nicht unbedingt in allen Zellen des Embryos eintreten muss, bewirkt die Einkreuzung der Integrase in den Kreuzungsnachkommen prinzipiell eine Chimärenbildung, wobei am A-Locus 3 Genotypen möglich sind: AA₀, A₁A₀, A₂A₀. Die Pflanzen können deshalb männlich sterile (AA₀) und fertile (A₁A₀, A₂A₀) Gewebesektoren besitzen. Beim Weizen ist die Chimärenbildung eher selten. In der Nachkommenschaft von A₁- und A₂-Pflanzen findet man jedenfalls keine Chimären mehr. Dies spricht dafür, dass Rekombination die Regel ist und schon in frühen Stadien der Embryonalentwicklung die Umwandlung des Provektors am A-Locus in den A₁- oder A₂-Typ eintritt. Genetisch homogene heterozygote A₁- und A₂-Linien lassen sich gewebekulturtechnisch aus Chimären isolieren. Durch Selbstung dieser Linien kann man dann homozygote A₁- und A₂-Linien gewinnen, darunter auch solche, die keine Integrase mehr enthalten. Diese Linien benutzt man für die Erzeugung des männlich sterilen Pollenempfängers der Hybridsaatgutproduktion.

A₁- und A₂-Pflanzen besitzen jeweils nur ein Barnase-Inteinfragment und können deshalb keine intakte Barnase bilden. Die aus der Kreuzung A₁A₁ x A₂A₂ hervorgehenden Nachkommen besitzen dagegen beide. Diese werden beide tapetumspezifisch exprimiert und in zwei getrennte Polypeptide übersetzt, worauf die

Inteinsequenzen assoziieren, einen Proteinspleißkomplex bilden und die N- und C-terminalen Exteine zur vollständigen Barnase verknüpfen. Die Nachkommen der Kreuzung haben alle den Genotyp A_1A_2 und sind männlich steril. Damit hat man den weiblichen Kreuzungspartner für die Hybridsaatgutproduktion.

Die beiden Teilgene der A_1A_2 -Pflanzen liegen am gleichen Locus, aber auf verschiedenen homologen Chromosomen. In der Meiose während der Keimzellenbildung segregieren sie, wobei jeder Gamet nur eines der beiden Teilgene, entweder A_1 oder A_2 erhält. Kreuzt man nun eine A_1A_2 -Pflanze mit einem beliebigen Wildtyp, so haben die Nachkommen mit einer Wahrscheinlichkeit von je 50% den Genotyp A_1A_0 oder A_2A_0 . Die so gewonnene Hybridsaat liefert also fertile Pflanzen.

Um den männlich sterilen Kreuzungspartner zu erhalten, kreuzt man A_1A_2 -Pflanzen mit einer homozygoten A_1 oder A_2 -Linie. A_1A_2 -Pflanzen sind männlich steril. Ihre Blüten können aber vom Pollen fertiler A_1A_1 - oder A_2A_2 -Linien bestäubt werden. Die Nachkommenschaft ist mit jeweils gleicher Wahrscheinlichkeit fertil (A_1A_1 , A_2A_2) oder männlich steril (A_1A_2). Der Kreuzungsprozess ist in Abb. 32 zusammengefasst.

Verglichen mit konventionellen Sterilitätssystemen hat das Teilgensystem wesentliche Vorteile. Nur der Pollenspender muss genetisch verändert werden, und man braucht keine Restorerene. Bei Pflanzen mit kleistogamen Blüten wie dem Weizen ist dies wichtig, da der Bau der Blüten einen hohen stetigen Pollenfluss zwischen verschiedenen Pflanzen verhindert und die Züchtung für die Hybridsaatproduktion gut geeigneter Linien nicht durch die Notwendigkeit erschwert wird, Transgene in beide Elternlinien einzuführen. Teilgensysteme sind bei vielen Arten anwendbar, da ihre Kernelemente (Integrase, Barnase, Inteine) nicht art- oder pflanzenspezifisch sind und sowohl bei Ein- als auch bei Zweikeimblättrigen funktionieren. Es müssen lediglich die Transformationsprotokolle und eventuell die Expressionssignale in den Genkassetten des Provektors an die Pflanzenart oder -gruppe angepasst werden. Ein Nachteil des Systems ist der insgesamt komplexe Züchtungsprozess, der zu den beiden Elternlinien A_1 und A_2 des männlich sterilen Elternteils führt. Beim Weizen sind - im Gegensatz zu *Arabidopsis* - die primären den Provektor A tragenden Transformanten noch biolistisch produziert worden, was oft komplexe Integrationsmuster liefert, die dann wiederum mehrfache nicht vorhersagbare Rekombinationsereignisse bei der ϕ C31-Integration provozieren. Die Genotypen aller Kreuzungen sind, abgesehen von der männlichen Sterilität, phänotypisch nicht unterscheidbar und können nur mit molekularbiologischen Methoden (PCR, DNA-Gelblot) identifiziert werden. Für die landwirtschaftliche Praxis sind diese Verfahren ungeeignet. Schließlich gehen bei Kreuzungen vom Typ $A_1A_1 \times A_1A_2$ oder $A_2A_2 \times A_1A_2$, die man zur Erhaltung des Pollenempfängers braucht, statistisch 50% der Nachkommen verloren, es sei denn man setzt einen Herbizidresistenz-Selektionsmarker ein.

Weniger als 1% des globalen Weizenanbaus entfallen gegenwärtig auf Hybride, was nicht nur am Fehlen eines praktikablen Hybridisierungssystems sondern auch an der Blütenbiologie des Weizens liegt. Die Morphologie der Weizenähren begünstigt die Kreuzbefruchtung nicht. Im Idealfall müsste der Weizen offene Blüten haben, die bei allen für die Hybridisierung infrage kommenden Linien gleichzeitig zur Blühreife gelangen. Der Pollen müsste langlebig, leicht und trocken sein, um effektiv durch Wind verfrachtet werden zu können. Beides trifft beim Weizen nicht zu. Barnase/Intein-Teilgensysteme werden deshalb wohl nur auf längere Sicht Eingang in die kommerzielle Hybridenzüchtung finden, könnten diese dann aber nicht nur beim Weizen revolutionieren. Die Studien von Gils, Kempe u. a. zeigen, dass sich mit komplementären Barnase/Intein-Genfragmenten männlich steriler für die Hybridsaatproduktion verwendbarer Weizen erzeugen lässt, gleichgültig, ob die Genfragmente auf derselben DNA liegen (*cis*-Konfiguration) oder Allele zweier homologer Chromosomen sind (*trans*-Konfiguration). Sie dokumentieren den ersten Fall einer inteinvermittelten *trans*-Aktivierung eines landwirtschaftlich wichtigen bei keinem der Eltern vorhandenen Merkmals. Transaktivierbare Intein-Teilgensysteme lassen sich auch für andere Anwendungen einsetzen. Sie können z. B. die horizontale Ausbreitung von Transgenmerkmalen durch Pollenflug verhindern, da der haploide Pollen nur ein Teilgen übertragen kann und das zur Expression des Merkmals nötige Genkomplement beim Pollenempfänger normalerweise fehlt. Ihr Einsatzspektrum reicht über die Hybridenzüchtung weit hinaus.

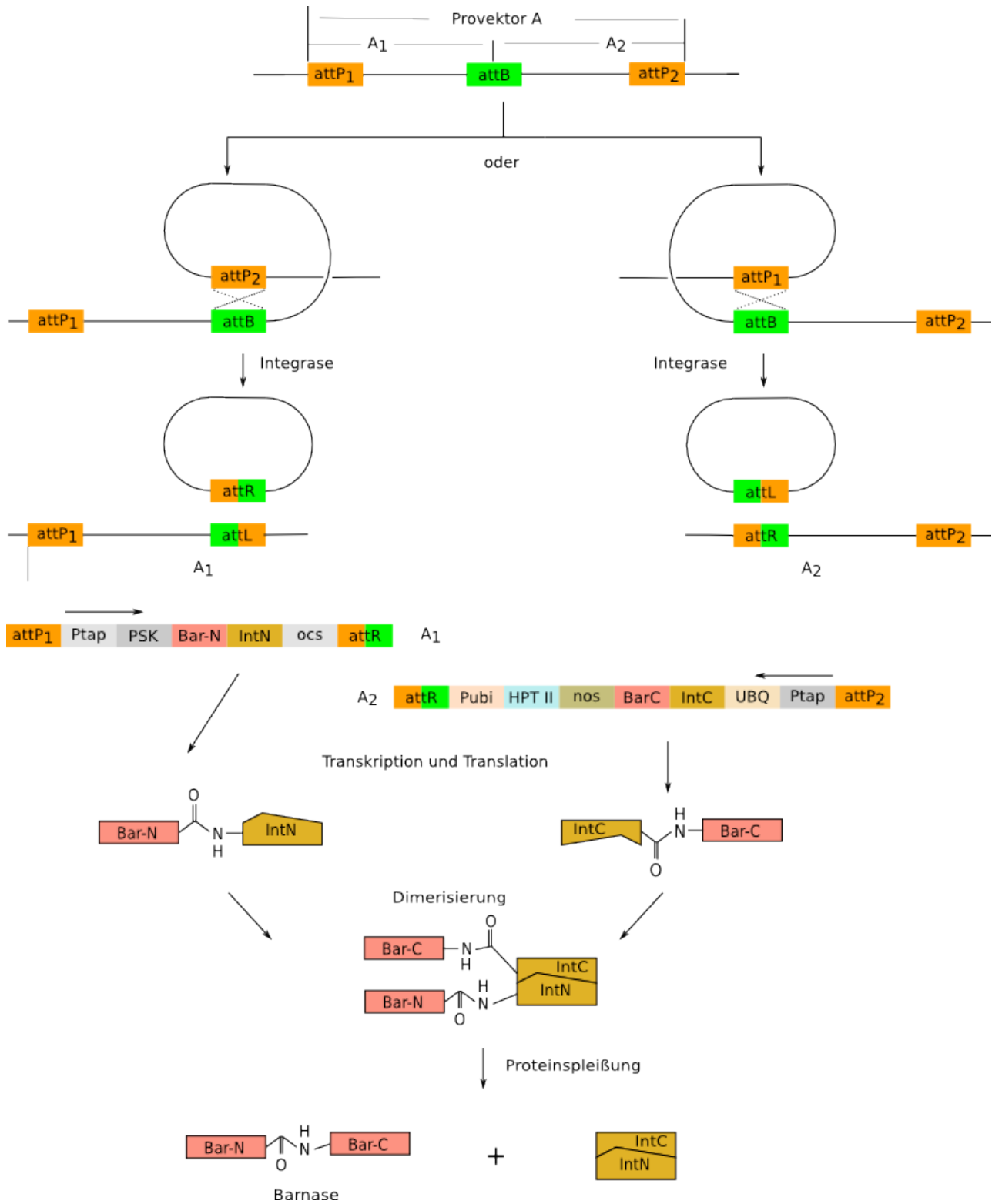
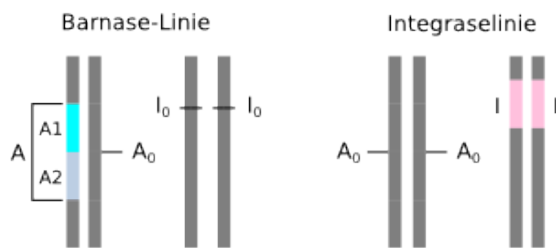


Abb. 31. Erzeugung der A₁- und A₂-Linie durch phiC31-Rekombination. Aus Kreuzungen zwischen hemizygoten A- und homozygoten I-Transgenikern hervorgehende Pflanzen können beide Merkmale erben. Sie tragen dann die Provektor-T-DNA und exprimieren die phiC31-Integrase. Unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitinpromoters P_{ubi} wird diese aktiv und kann dann in jeder Zelle des Embryos eines von zwei möglichen Rekombinationsereignissen katalysieren. Rekombination zwischen attB und attP₁ bewirkt die Exzision des links von attB liegenden Provektorarms A₁, Rekombination zwischen attB und attP₂ die des rechten Arms A₂. In Zellen, wo keine Rekombination stattfindet, bleibt der Provektor erhalten. Wenn die A-Linie, in welche die Integrase eingekreuzt wird, nur eine Kopie des Provektors trägt, gibt es in der Nachkommenschaft am A-Locus drei mögliche Genotypen: AA₀ (kein Rekombination), A₁A₀ (Exzision von A₂), A₂A₀ (Exzision von A₁). A₀ ist die leere Insertionsstelle auf dem homologen Wildtypchromosom des Chromosomenpaars mit dem A-Locus.

Der Mechanismus der phiC31-Rekombination ist in der Pflanzenzelle derselbe wie in einem phageninfizierten Bakterium. In der Pflanze liefert er jedoch ein anderes Resultat. Im Bakterium findet die Rekombination intermolekular zwischen zwei verschiedenen DNA-Molekülen statt und bewirkt die Integration des Phagen ins Bakterienchromosom. In der Pflanze ist sie intramolekular innerhalb ein- und desselben DNA-Moleküls, welches hierzu eine Paarungsschleife bildet. Dies bewirkt die Exzision des zwischen den gepaarten att-Sequenzen liegenden DNA-Abschnitts aus dem Pflanzenchromosom. Der ausgeschnittene Teil der Provektor-DNA wird zu einem kleinen Ringmolekül, das in der Pflanzenzelle nicht replikationsfähig ist und im Laufe von Wachstum und Entwicklung verlorenght. Die beiden att-Stellen werden bei der Rekombination modifiziert und zu hybriden att-Sequenzen attL, attR. Im Bakterium vermag die Integrase diese Sequenzen zu erkennen und einen als Prophagen ins Bakteriengenom integrierten phic31-Phagen wieder auszuschneiden. Dazu benötigt sie aber zusätzliche Phagen- und Bakterienproteine, welche in der Pflanze fehlen. Einmal entstanden, sind genetisch homogene A₁- und A₂-Pflanzen deshalb genetisch stabil ([Kempe u. a., 2014](#)).

1. Einkreuzung des Integrasesgens

Chromosomenkonfiguration der Kreuzungspartner

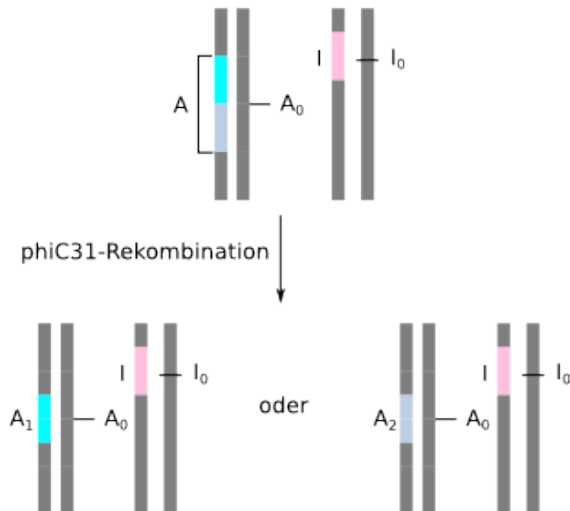
Kreuzungstyp: $AA_0I_0I_0 \times A_0A_0II$

Gameten und Genotypen

	AI_0	AI_0	A_0I_0	A_0I_0
A_0I	AA_0II_0	AA_0II_0	$A_0A_0II_0$	$A_0A_0II_0$
A_0I	AA_0II_0	AA_0II_0	$A_0A_0II_0$	$A_0A_0II_0$
A_0I	AA_0II_0	AA_0II_0	$A_0A_0II_0$	$A_0A_0II_0$
A_0I	AA_0II_0	AA_0II_0	$A_0A_0II_0$	$A_0A_0II_0$

■ männlich steril (8/16)

Aufspaltung des Prolocus in der Embryonalentwicklung

2. Erzeugung homozygoter A_1 - und A_2 -Linien durch SelbstungKreuzungstyp: $A_nA_0II_0 \times A_nA_0II_0$ ($n=1,2$)

Gameten und Genotypen

	A_nI	A_nI_0	A_0I	A_0I_0
A_nI	A_nA_nII	$A_nA_nII_0$	A_nA_0II	$A_nA_0II_0$
A_nI_0	$A_nA_nII_0$	$A_nA_nI_0I_0$	$A_nA_0II_0$	$A_nA_0I_0I_0$
A_0I	A_nA_0II	$A_nA_0II_0$	A_0A_0II	$A_0A_0II_0$
A_0I_0	$A_nA_0II_0$	$A_nA_0I_0I_0$	$A_0A_0II_0$	$A_0A_0I_0I_0$

■ homozygot für A_n und integraserefrei (1/16)

3. Erzeugung des weiblichen Kreuzungspartners für die Hybridsaatgutproduktion

Kreuzungstyp: $A_1A_1 \times A_2A_2$ Ergebnis: A_1A_2 (4/4), männlich steril

4. Produktion des Hybridsaatguts

 $A_1A_2 \times A_0A_0$

	A_1	A_2
A_0	A_1A_0	A_2A_0
A_0	A_1A_0	A_2A_0

□ fertil (4/4)

5. Erhaltung der männlich sterilen Linie

 $A_1A_2 \times A_1A_1$

	A_1	A_2
A_1	A_1A_1	A_1A_2
A_1	A_1A_1	A_1A_2

 $A_1A_2 \times A_2A_2$

	A_1	A_2
A_2	A_1A_2	A_2A_2
A_2	A_1A_2	A_2A_2

■ männlich steril (2/4)

Abb. 32. Hybridsaatgutproduktion mit dem Barnase-Intein-Teilgensystem.

1. Erzeugung des männlich sterilen Elters. Die Transformation des Wildtyps mit dem Provektor von Abb. 30 liefert männlich sterile transgene Elternpflanzen. Sie werden mehrfach mit dem Wildtyp zurückgekreuzt, bis man genetisch stabile Individuen erhält, welche im Genom nur eine Kopie des Provektors tragen. Diese kreuzt man mit einer Linie, welche die phiC31-Integrase exprimiert. Wenn Integrasegen und Provektor auf verschiedenen Chromosomenpaaren liegen, segregieren sie in Meiose und Befruchtung unabhängig voneinander nach dem Zufallsprinzip. Es gibt 16 mögliche Gametenkombinationen, die alle gleich wahrscheinlich sind und 2 verschiedene Genotypen AA_0I_0 , $A_0A_0I_0$. A ist der Locus mit dem Provektor, I der mit dem Integrasetransgen. A_0 , I_0 symbolisieren die leeren Insertionsstellen auf dem Wildtypchromosom des jeweiligen Chromosomenpaars. Individuen mit dem Genotyp AA_0I_0 sind männlich steril. Männlich sterile Individuen tragen den Provektor und exprimieren die phiC31-Integrase. In der Embryonalentwicklung dieser Pflanzen kann letztere die orts-spezifischen Deletionen zwischen den attB- und attB-Stellen des Prolocus katalysieren. Dabei können zwei alternative Reaktionen entweder die Löschung des C-terminalen oder des N-terminalen Teils des Prolocus bewirken, wodurch die Locusderivate A_1 oder A_2 gebildet werden. Pflanzen, welche nur A_1 oder A_2 , nicht aber A besitzen, sind fruchtbar, da sie kein vollständiges Barnaseprotein bilden können.
2. Durch Selbstung dieser Pflanzen (Kreuzungstyp $A_nA_0I_0 \times A_nA_0I_0$, $n = 1,2$) lassen sich mit Erfolgswahrscheinlichkeiten von 3/16 ($A_nA_nI_0$) und 1/16 ($A_nA_nI_0I_0$) homozygote A_1 - und A_2 -Linien gewinnen. $A_nA_nI_0I_0$ ist homozygot für beide Loci und enthält kein Integrasetransgen mehr.
3. Die Kreuzung zweier homozygoter A_1 - und A_2 -Linien liefert eine Tochtergeneration, die nur aus männlich sterilen Pflanzen besteht. Damit hat man den weiblichen Kreuzungspartner für die Hybridsaatgutproduktion.
4. Als Pollenspender für die Saatguterzeugung kann eine beliebige Wildtyplinie A_0A_0 verwendet werden. Aus der Hybridsaat keimen Sämlinge mit Genotyp A_1A_0 oder A_2A_0 . Diese können wieder nur eines der beiden Barnasefragmente bilden und entwickeln sich zu fertilen Pflanzen.
5. Zur Erhaltung der männlich sterilen Linie A_1A_2 kreuzt man diese mit der homozygoten A_1 - oder A_2 -Linie. Die Nachkommenschaft ist statistisch jeweils zur Hälfte homozygot und fruchtbar oder heterozygot und männlich steril. Die bei diesem Kreuzungsprogramm einzusetzenden Genotypen sind abgesehen von der männlichen Sterilität äußerlich nicht unterscheidbar, lassen sich aber mit molekularbiologischen Methoden (DNA-Gelblot, PCR) identifizieren ([Kempe u. a., 2014](#)).

3 Mais

3.1 Biologie

3.1.1 Morphologie

Mais (*Zea mays*, Abb. 33) ist ein einjähriges, 1-4 m, in Deutschland im Mittel 1,7 - 2,7 m hohes Gras. Die Pflanze entwickelt meist nur einen Haupttrieb, der in Knoten und 8 - 12 Internodien (Knotenzwischenstücke) gegliedert ist. Im Gegensatz zu den übrigen Getreidearten und Weidegräsern ist der Stengel nicht hohl, sondern markhaltig. Das Mark ist ein Speichergewebe, in dem vor der Befruchtung und bei unterbrochener Kolbenbildung Assimilationsprodukte angesammelt werden. Ins Mark eingelagert sind die Leitbündel, in denen



Abb. 33. Bt-Maisfeld ([EuropaBio](#)).

Wasser, Salze und organische Verbindungen transportiert werden. Aus jedem oberirdischen Knoten entwickelt sich ein Blatt. Die Blätter sind wechselständig (spiralig) am Stengel angeordnet. Das voll entwickelte Blatt besteht aus der dünnen Blattspreite und der dicken und steifen Blattscheide. Letztere umfasst das Internodium oberhalb des Knotens, dem sie entspringt. Die in Deutschland angebauten Sorten bilden im Mittel 8 - 16 Blätter.

Das Wurzelwerk der Maispflanze besteht aus Keimwurzeln und Kronenwurzeln (Abb. 34), welche aus unterirdischen Stengelknoten hervorgehen oder als Luftwurzeln im erdnahen Bereich entstehen. Die primäre Keimwurzel ist bereits im Keimling angelegt und stößt bei beginnender Keimung durch die Samenschale. Danach erscheinen 3-5 sekundäre Keimwurzeln. Mit zunehmender Wachstumsdauer und Ausbildung der Kronenwurzeln verlieren die

Keimwurzeln an Bedeutung. Die Ausbildung des Wurzelsystems hängt ab von Bodenart und Nährstoffangebot. Die seitliche Ausdehnung der Wurzeln reicht bis zu 1 m, ein Teil kann bis in Tiefen von 2,50 m vordringen.

Mais ist eine einhäusige (monözische) Pflanze, bei der weibliche (Abb. 35) und männliche (Abb. 36) Blüten am gleichen Individuum gebildet werden. Die männlichen Blüten bilden eine Rispe an der Spitze des Haupttriebes, während die weiblichen Blüten in dicken Kolben in den Blattachseln ausgebildet werden. Mit der Ausbildung des terminalen männlichen Blütenstandes wird das Wachstum der Maispflanze abgeschlossen. Die Blühdauer der Rispe beträgt in Abhängigkeit von der Witterung 10 - 14 Tage. Die Blüte setzt an der Spitze ein, danach folgen die Seitenäste. Die Pollenbildungsphase dauert ca. 2 Wochen. Reifer Pollen trocknet an der Luft schnell aus und ist deshalb nur 10 - 30 min befruchtungsfähig.



Abb. 34. Kronenwurzeln an der Stengelbasis einer Maispflanze.

Die weiblichen Blüten stehen in dicken kolbenförmigen Blütenständen, die in den Achseln der Stengelblätter ausgebildet werden. Der ganze Kolben ist von großen Tragblättern (Lieschblättern) umhüllt, die zusammen mit dem Kolben (Abb. 37) die Ähre bilden. In der Regel kommt es nur in halber Höhe des Stengels zur vollen Ausbildung von einem oder auch von zwei weiblichen Blütenständen. Die Fruchtknoten der reifen weiblichen Blüten sind zu Griffeln ausgezogen, die so stark verlängert sind, dass sie aus den Lieschblättern hervordringen. Mit einer Länge von bis zu 30 cm sind sie länger als bei allen anderen Pflanzen. Die Blüten sind etwa 2 Wochen befruchtungsfähig. Ursprünglich war der Mais eine proterandrische Pflanze, bei der die männlichen Blüten vor den weiblichen heranreifen. Die Proterandrie ist ein einfacher bei Pflanzen verbreiteter Mechanismus zur Verhinderung der Selbstbestäubung. Jahrhundertlange

Selektion bewirkte, dass bei vielen Sorten männliche und weibliche Blüten nahezu gleichzeitig zur Reife kommen. Im Maisfeld bewirkt dies einen besseren Fruchtausatz. Bei den heutigen Sorten beginnt die Rispenblüte an einer Pflanze 2-4 Tage vor dem Erscheinen der Narbenfäden. Diese geringe Zeitverschiebung reicht noch aus, damit fast alle weiblichen Blüten (über 90 %) fremdbefruchtet werden. Nach der Befruchtung beginnt die Kornbildung, und die Narbenfäden trocknen aus. Die Kolbenentwicklung wird stark von der Assimilationsleistung des direkt unterhalb ansetzenden Blattes beeinflusst.



Abb. 35. Weiblicher Blütenstand, an der Spitze ein dichtes Büschel langer Narbenfäden. Die noch unentwickelte Ähre ist vollständig von Lieschblättern eingeschlossen. Es müssen viele Pollenkörner auf die Narben fallen, damit jede Blüte sich zu einem Korn entwickelt (Wikipedia).



Abb. 36. Männlicher Blütenstand (Wikipedia).

Im Unterschied zu den Körnern anderer Getreidearten sind Maiskörner nackt, d. h. nicht von Blütenblättern (Deck- und Vorspelzen) eingeschlossen. Botanisch ausgedrückt ist das Maiskorn wie bei anderen Gräsern eine Karyopse. So nennt man Früchte, bei denen die Schale des Samens fest mit der Fruchtwand verwachsen ist. Auf die harte Außenwand folgt nach innen die eiweißhaltige Aleuronschicht, dann das stärkehaltige Endosperm, das Nährgewebe des Samens. Der Keimling liegt an der Basis des Kornes und ist mit seinem schildförmigen Keimblatt dem Endosperm angepresst. Die gelbe Farbe der meisten Maiskörner rührt von den Carotinoiden her, die im Endosperm abgelagert sind. Bei Sorten mit andersfarbigen Körnern werden in der Aleuronschicht als Blütenfarbstoffe weit verbreitete Anthocyane gebildet. Durch diese oft rötlichen oder purpurfarbenen Verbindungen wird die gelbe Farbe des Endosperms überdeckt. Manche Zuckermaislinien haben Körner mit tief gefurchter runzeliger Oberfläche. Bei diesen Mutationen ist die Stärkebildung unterbrochen, und das Endosperm ist zuckerhaltig. Wenn die Körner trocknen, verlieren sie viel Wasser und schrumpfen dabei ein.

3.1.2 Stoffwechsel

Mais, Zuckerrohr und verschiedene andere Pflanzen gehören zu einem besonderen Stoffwechseltyp, den C_4 -Pflanzen. Im Gegensatz zu den übrigen, den C_3 -Pflanzen, haben C_4 -Pflanzen einen CO_2 -Konzentrierungsmechanismus entwickelt, der es ihnen erlaubt, in den Blättern dort, wo die endgültige CO_2 -Fixierung durch das Enzym Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (RUBISCO) stattfindet, eine hohe stationäre CO_2 -Konzentration aufrechtzuerhalten und damit einen Funktionsmangel dieses Enzyms, nämlich seine geringe Bindungsfähigkeit (Affinität) für CO_2 , auszugleichen. C_4 -Pflanzen können die Photosynthese noch bei CO_2 -Konzentrationen in Gang halten, bei denen C_3 -Pflanzen verhungern müssen. Der untere Kompensationspunkt der Photosynthese, bei dem sich der CO_2 -Verbrauch durch Photosynthese und die CO_2 -Produktion durch Atmung die Waage halten, liegt bei manchen C_4 -Pflanzen bei $5 \mu\text{l/l}$, bei C_3 -Pflanzen bei $50 \mu\text{l/l}$.

Die wirksamere Form der CO_2 -Fixierung ermöglicht den C_4 -Pflanzen außerdem ein weitaus rascheres Wachstum bei hohen Lichtintensitäten und warmen Temperaturen, da die CO_2 -Konzentration nie zum begrenzenden Faktor der Photosynthese wird. Es ist daher verständlich, dass C_4 -Pflanzen vor allem in trockenen und stark besonnten Gegenden vertreten sind. Auch in gemäßigten Breiten kann Mais bei ausreichender Sonneneinstrahlung mehr Trockenmasse produzieren als andere Getreidearten, was diese nur durch eine längere Vegetationszeit

ausgleichen können. Mais verwertet auch den Stickstoff besonders effizient und verbraucht davon bei gleicher Assimilationsleistung 20 - 30% weniger als andere Kulturpflanzen. Verglichen mit diesen kommt er wegen seines effizienten Wasserleitungs- und Transpirationssystems auch mit deutlich weniger Wasser aus.

3.1.3 Vermehrung

Mais vermehrt sich normalerweise nur durch Samen. Obwohl die Pflanze vollständig selbstkompatibel ist, werden infolge der von den Vorfahren stammenden noch partiell vorhandenen Proterandrie 95% der weiblichen Blüten fremd- und nur 5% selbstbestäubt. Im Laufe der langen Domestizierung sind dem Mais wie auch anderen Kulturpflanzen alle natürlichen Mechanismen der Samenverbreitung weggezüchtet worden, und der Mais ist deshalb vollständig auf die menschliche Fürsorge angewiesen. Die Körner der reifen Kolben werden nicht ausgestreut, sondern bleiben fest mit der Ähre verbunden. Fällt diese zu Boden, so keimen so viele Körner gleichzeitig, dass wegen der Konkurrenz kaum eine Pflanze reift. Eine unkontrollierte Verbreitung ist deshalb selbst in warmen Regionen, wo die Pflanze den Winter überlebt, trotz des riesigen globalen Anbauvolumens äußerst selten. Es ist möglich, Mais mithilfe moderner Zell- und Gewebekulturtechniken zu vermehren. Für die Maisproduktion sind diese Verfahren ungeeignet. Sie sind aber unentbehrlich, um den Mais zu transformieren. Die Regeneration kompletter fertiler Maispflanzen aus transformierten Zell- und Gewebekulturen ist der schwierigste und zeitraubendste Teil bei der Entwicklung von Biotechmais.



Abb. 37. Ähre mit unreifen Körnern; an der Spitze die eingetrockneten Narbenfäden ([EuropaBio](#)).



Abb. 38. Teosinte und Mais ([H. Sädler](#)).

3.1.4 Systematik und Phylogenie

Systematisch gehört Mais zu den Gräsern (Familie *Poaceae*, Untergruppe (Tribus) *Andropogoneae*). Zur gleichen Tribus gehören auch Hirse und Zuckerrohr. Der Name *Zea* kommt aus dem Griechischen (Zeia) und ist wahrscheinlich die Bezeichnung für ein altes Futtergras. Die Gattung *Zea* hat 4 Arten, von denen nur *Zea mays* wirtschaftliche Bedeutung hat. Die restlichen 3 Arten werden als UnterGattung *Teosinte* zusammengefasst. Die Teosinten sind Wildgräser Zentralamerikas und Mexikos. Die Tribus *Andropogoneae* besteht aus den beiden in Amerika beheimateten Gattungen *Zea* und *Andropogon* und 5 weiteren, die in Asien vorkommen.

Die Stammesgeschichte des Mais ist nicht vollständig geklärt. Allgemein wird angenommen, dass der heutige Mais vor allem auf die Gattungen *Teosinte* (Abb. 38) und in zweiter Linie *Tripsacum* zurückgeht. Das Zentrum seiner Entstehung liegt in den indianischen Hochkulturen Mittelamerikas und Mexikos. Der exakte Beginn der Domestizierung ist unbekannt. Nach archäologischen Funden begann sie vor 6000 - 8000 Jahren unabhängig in mehreren Regionen in Mittelamerika, Mexiko und dem Südwesten der USA. Von seinen Ursprungspflanzen unterscheidet sich der Mais vor allem durch seinen hochaufragenden unverzweigten Spross und die riesigen Kolben, an denen in vielzeiliger Anordnung nackte, fest angewachsene Körner sitzen. Der morphologische Vergleich mit den heute lebenden Teosinten (Abb. 39) vermittelt einen Eindruck von dem langen, mühevollen züchterischen Weg, der im Laufe der Domestizierung zurückzulegen war. In Europa stellt der Mais eine relativ junge Kulturpflanze dar. Die Europäer lernten ihn durch Kolumbus kennen, der ihn vor rund 500 Jahren von einer seiner ersten Reisen nach Europa brachte.

Mehr als 400 Jahre sollten noch vergehen, bevor der Mais zunächst in den klimatisch begünstigten Mittelmeerländern und schließlich auch in Mitteleuropa heimisch wurde.

3.1.5 Hybridisierung, Auskreuzung, Genfluss

Mais bildet mit allen Teosinten fruchtbare Hybride. Ihre Vitalität ist allerdings gering. Molekularbiologische Daten zeigen einen messbaren Genfluss zwischen Teosinten und Mais, allerdings mit geringer Frequenz. Da dem Mais alle natürlichen Samenverbreitungsmechanismen fehlen, geschehen Auskreuzungen fast nur durch Pollenflug in einem Zeitfenster von ca. 14 Tagen. Insektenbestäubung ist zwar möglich, aber ohne große Bedeutung, da Bienen und andere pollentragenden Insekten die weiblichen Maisblüten nicht besuchen. Bei Windbestäubung muss der Pollen während der 30 min, die er biologisch aktiv ist, eine weibliche Blüte finden. Aus diesen Gründen ist es relativ einfach, durch Einhaltung von Pflanzabständen oder mechanische Barrieren die ungewollte Hybridisierung von Maislinien oder von Mais mit seinen wilden Verwandten zu verhindern. Nach geltenden OECD-Richtlinien soll zur Saatgutproduktion zwischen verschiedenen Inzuchtlinien ein Pflanzabstand von mindestens 200 m eingehalten werden. Dies genügt nach den bisherigen Erfahrungen, um die Linien mit einer Reinheit von 99,9 % zu erhalten.



Abb. 39. Ähren von Teosinte (links), Mais (rechts) und einer Kreuzung zwischen Teosinte und Mais (Mitte) ([J. Doebley](#)).

3.1.6 Unkräuter, Schädlinge und ihre Bekämpfung

3.1.6.1 Unkräuter und Herbizide

Herbizide sind chemische Unkrautbekämpfungsmittel. Sie sind im Maisbau und in der gesamten modernen Landwirtschaft unentbehrlich, da der Verzicht auf Unkrautbekämpfungsmaßnahmen zu untragbaren Ernteverlusten führt und eine wirksame mechanische oder manuelle Bekämpfung schnell wachsender Unkräuter und Ungräser in großen Monokulturen aus technischen und wirtschaftlichen Gründen unrealistisch ist. Man kennt heute rund 350 verschiedene Wirkstoffe. Da viele von diesen unerwünschte Umweltwirkungen haben, ist die agrochemische Industrie ständig auf der Suche nach besseren und umweltverträglicheren Herbizidwirkstoffen. Nach der Anwendungsform unterscheidet man nichtselektive Voraufbauherbizide und selektive Nachaufbauherbizide. Erstere müssen vor dem Auflaufen, d. h.

der Keimung der jungen Kulturpflanzen, ausgebracht werden, weil sie als nichtselektive Totalherbizide andernfalls auch die Kulturpflanzen vernichten würden. Letztere können, da sie nur gegen bestimmte Unkräuter und nicht gegen die zu schützenden Kulturpflanzen wirken, auch nach dem Auflaufen eingesetzt werden. Eine Mittelstellung zwischen den beiden Gruppen nehmen Breitbandherbizide ein, die zwar gegen viele Unkräuter wirken, aber auch für die Mehrzahl der Kulturpflanzen giftig sind. Alle Herbizide sollten leicht abbaubar und müssen in den anzuwendenden Konzentrationen für Menschen und Tiere unschädlich sein. Einige Totalherbizide haben wegen ihrer relativen Ungiftigkeit, ihrer leichten Abbaubarkeit im Boden und Oberflächenwasser und der mit ihrer Anwendung verbundenen Verbilligung der Agrarproduktion enorme Bedeutung in der Landwirtschaft erlangt. Ihrer ausschließlichen Verwendung stand bisher entgegen, dass sie das Auflaufen von Unkräutern, die erst nach der Aussaat der Kulturpflanzen keimen, nicht verhindern können und somit die zusätzliche Verwendung selektiver Herbizide nicht überflüssig machen. Der Anbau gegen die modernen Totalherbizide resistenter transgener Sorten beseitigt diesen Nachteil und ermöglicht es, Spritzmittel einzusparen: Das Totalherbizid muss nicht mehr zur Vorbeugung eingesetzt werden, sondern nur noch, wenn Bedarf besteht, und die bisher notwendigen selektiven Herbizide werden nicht mehr gebraucht. Dadurch sinken nicht nur die Produktionskosten, sondern es sinkt auch die Belastung des Ökosystems. Die meisten Totalherbizide wirken, indem sie ein Enzym blockieren, welches einen wesentlichen Schritt in einem für alle Pflanzen lebenswichtigen Stoffwechselweg (Photosynthese, Biosynthese von Aminosäuren) katalysiert. Deshalb ist ihre Wirkung notwendigerweise nichtselektiv. Phosphinothricin (Ammoniumglufosinat) ist der Wirkstoff von Basta und verschiedenen anderen Herbiziden (Rely®, Finale®, Liberty®), die weltweit eingesetzt werden. Es ist ein Bruchstück des Tripeptids L-Phosphino-thricyl-L-alanyl-L-Alanin, welches erstmals aus den Strahlenpilzen *Streptomyces viridichromogenes* und *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde. Glufosinat ist ein Struktur analogon der Glutaminsäure und hemmt das pflanzliche Enzym Glutaminsynthase, ein Schlüsselenzym des Aminosäurestoffwechsels, welches das in der Zelle mit Ammoniumionen im Gleichgewicht stehende Ammoniak in die Aminosäure Glutamin einbaut. Die Folge ist ein rascher Anstieg der Konzentration von

Ammoniumionen und die Erschöpfung des Vorrats an Glutamin und mehreren anderen Aminosäuren in der Pflanze. Die Pflanzen bleichen aus, stellen die CO_2 -Fixierung ein und welken innerhalb von Stunden. Die Ergebnisse zahlreicher toxikologischer Studien haben gezeigt, dass Phosphinothricin und seine kommerziellen Rezepturen bei vorschriftsmäßigem Einsatz für Anwender und Verbraucher sicher sind. Eine Schädigung des Ökosystems ist nicht anzunehmen, da die Schadensschwelle bei allen untersuchten Nichtzielorganismen deutlich oberhalb der bei normaler Anwendung im Freiland auftretenden Wirkstoffkonzentrationen liegt. Glyphosat (N-Phosphono-methyl-Glycin) ist der Wirkstoff der Totalherbizide Roundup™ und Touchdown™. Die einfache synthetische Verbindung ist ein starker kompetitiver (das natürliche Substrat des Enzyms verdrängender) Hemmer der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS). EPSPS ist ein Enzym des Shikimatsynthesewegs und katalysiert die Verknüpfung von Phosphoenolpyruvat und Shikimat-3-Phosphat zu 5-Enolpyruvyl-3-Shikimat-Phosphat, einem Vorläufer der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Diese Aminosäuren sind nicht nur wesentliche Bestandteile der Proteine sondern werden zur Synthese vieler anderer von Pflanzen gebildeter aromatischer Verbindungen gebraucht. Die Blockierung der EPSPS durch Glyphosat enthaltende Herbizide bewirkt daher den Ausfall zentraler Stoffwechselwege, was schnell zum Absterben der Pflanzen führt. Das Enzym kommt nur bei Pflanzen und Mikroorganismen vor, aber nicht bei Tieren. Diese synthetisieren selbst keine aromatischen Aminosäuren, sondern nehmen diese mit der Nahrung auf. Dies erklärt, warum Glyphosat für Tiere kaum toxisch ist. Diese Eigenschaften machen EPSPS zu einem guten Angriffspunkt für Herbizide. Ein Beispiel eines schwach toxischen Breitbandherbizids ist das Imidazolinonherbizid Imazethapyr. Die orale Wirkstoffdosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben (LD50), ist bei Ratten >5000 mg/kg Körpergewicht. Imidazolinonherbizide hemmen kompetitiv die Acetohydroxysäuresynthase, das erste Enzym im Biosyntheseweg der verzweigten Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin. Dies führt zur Unterbrechung der Proteinsynthese, der DNA-Synthese, des Zellwachstums und schließlich zum Tod der Pflanzen. Zahlreiche Gräser und zweikeimblättrige Unkräuter sind gegen den Wirkstoff empfindlich. Zu den toleranten Kulturpflanzen gehören Soja, Erdnuss, Bohnen, Erbse, Alfalfa und imidazolinonresistenter Mais (s. u.).

3.1.6.2 Insektenschädlinge im Maisfeld

Der Maiszünslerkomplex

Der Mais wird wie andere Kulturpflanzen von einer Vielzahl von Schädlingen und Krankheitserregern befallen, die in großen Monokulturen, wie sie in den Hauptanbaugebieten zu finden sind, oft geradezu ideale Ausbreitungsbedingungen finden. Zu den bedeutendsten Fraßschädlingen gehört eine Gruppe unscheinbarer kleiner Schmetterlinge mit dem Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*, Abb. 40) als bekanntestem Vertreter. Die ursprünglich in Europa beheimatete Art wurde um 1920 in die Vereinigten Staaten eingeschleppt, wo sie als European corn borer bekannt ist. In Süddeutschland und im Oderbruch ist der Maiszünsler schon weit verbreitet. Im Rheinland arbeitet er sich, vermutlich infolge der Klimaerwärmung, immer weiter nach Norden vor. Maiszünsler kommen in den meisten Anbaugebieten vor und infizieren in den gemäßigten Zonen rund 40%, in den Subtropen und Tropen rund 60% der Anbauflächen. Im Maisgürtel der USA erreichen die durch Maiszünsler verursachten Ernteverluste 4 - 10% der Ernte, das ist rund die Hälfte der durch Schadinsekten verursachten Ernteverluste. Die in Amerika und Kanada angerichteten wirtschaftlichen Schäden übersteigen eine Mrd. USD im Jahr. Bei starkem Befall kann es bis zu 30% Ertragsverluste geben. Der Lebenszyklus des Maiszünslers ist demjenigen des Baumwollkapselbohrers ähnlich. Im kühleren Mitteleuropa gibt es nur eine Zünslergeneration im Jahr. Etwa ab Mitte Juni fliegen die Falter in die noch jungen Maisbestände. An der Unterseite der Maisblätter legen die Weibchen ihre Eier ab. Etwa eine Woche später schlüpfen die Raupen (Abb. 41) und bohren sich schon bald in die Stengel der noch jungen Maispflanzen ein, wo sie sich bis zum Herbst nach unten fressen. Der Fraß der Zünsler schränkt die Wasser- und Nährstoffversorgung der Maispflanze ein. Der Stengel wird ausgehöhlt und knickt schließlich ab. Auch der Maiskolben kann befallen werden. Den Winter überdauern die Raupen in den Stoppeln oder im Wurzelbereich. Im Frühjahr verpuppen sie sich, bis dann im Juni wieder junge Falter schlüpfen. Infolge des Insektenbefalls kommt es an den geschädigten Pflanzen oft zu einem Sekundärbefall mit Schimmelpilzen, da die Fraßspuren der Raupen Einfallstore für Pilzsporen bilden, welche im Innern des Stengels optimale Entwicklungsmöglichkeiten finden. Vor allem Pilze der Gattung *Fusarium* sind hier zu nennen, die hauptsächlich Mais und Getreide befallen. Oft führt der Insektenbefall zu einer höheren Belastung der aus Mais hergestellten Futter- und Lebensmittel mit Fusarientoxinen. Bei Schweinen führen diese Pilzgifte nachweislich zu erheblichen Gesundheitsschäden. Mit konventionellen Mitteln ist der Maiszünsler nur schwer zu bekämpfen. Nachdem die Raupen aus den Eiern geschlüpft sind, fressen sie sich schnell in den

Stengel der befallenen Maispflanze, wo sie vor natürlichen Feinden ebenso wie vor Insektiziden sicher sind. Letztere müssen deshalb in jenen 2-3 Tagen gespritzt werden, welche die frisch geschlüpften Raupen brauchen, um die für sie sicheren Stengel zu erreichen. Zwar gehört der Maiszünsler ebenso wie der Baumwoll-



Abb. 40. Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) auf einem Maisblatt; ausgewachsenes Weibchen ([USDA, 2016](#)).



Abb. 41. Maiszünslerlarve (*Ostrinia nubilalis*); ([USDA, 2016](#)).

kapselbohrer zum Wirtsbereich von *Bacillus thuringiensis*, jedoch wirken auch die klassischen Bt-Präparate nur, wenn sie die Zünsler außerhalb des Stengels erreichen. Da es kein effektives Konzept gibt, verzichten viele Landwirte auch in Befallsgebieten auf gezielte Maßnahmen gegen den Zünsler und nehmen die Ernteverluste in Kauf. Der in zahlreichen außereuropäischen Ländern bereits seit Jahren erfolgreiche Anbau insektenresistenter transgener Bt-Maissorten hat eine völlig neue Situation geschaffen. Er ermöglicht eine wirksame, umweltschonende und für den Menschen ungefährliche Bekämpfung des Maiszünslerkomplexes. Dies wird durch eine Fülle von Labor- und Freilanduntersuchungen, die in den letzten 15 Jahren vor und während der Kommerzialisierung von Bt-Mais durchgeführt wurden, zweifelsfrei belegt.



Abb. 42. Nach Pollenkörnern suchender Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera*) auf den Narbenfäden einer Ähre ([USDA, 2016](#)).

Der Maiswurzelbohrer

Der Maiswurzelbohrer (*Diabrotica spec.*, Abb. 42) ist neben dem Maiszünsler einer der schlimmsten Insektenschädlinge des Maisanbaus. Seine Heimat ist Nordamerika. Am weitesten verbreitet sind *Diabrotica virgifera* (western corn root worm) und *Diabrotica barberi* (northern corn rootworm). In den USA infiziert *Diabrotica* 8 Mha, rund 1/4 der Maisanbauflächen. Die infizierte Fläche wächst um 2,6% pro Jahr. Schätzungen zufolge waren in den USA im Jahr 2013 15 Mha (39 Millionen acres) vom Maiswurzelbohrer befallen. Die Hauptursache seines Vordringens ist wohl darin zu sehen, dass Mais gewöhnlich in Rotation mit Soja gepflanzt wird und der Maiswurzelbohrer Rassen entwickelt hat, die ihre Eier in Sojafeldern ablegen und

sich dort entwickeln können. Ohne Bekämpfung verursachen die Schädlinge Ernteverluste von 9 - 28%. *Diabrotica* braucht mehr Insektizide als jeder andere Maisschädling und verursacht Kosten von ca. 1 Mrd. USD im Jahr. Der Schädling wurde in Europa zum ersten Mal 1992 in der Nähe des Belgrader Flughafens festgestellt. Man nimmt an, dass er über Maisimporte aus Nordamerika während des Krieges ins frühere Jugoslawien gelangte. In den folgenden Jahren breitete sich der Maiswurzelbohrer in Ost- und Südosteuropa kontinuierlich weiter aus. Aus Serbien, Ungarn und Rumänien sind bereits wirtschaftliche Schäden gemeldet worden. Nach aus den genannten Ländern vorliegenden Erfahrungen muss etwa 4-5 Jahre nach dem ersten Nachweis des Schädlings mit den ersten wirtschaftlichen Schäden gerechnet werden. Nach Italien, Frankreich, Österreich und in die Schweiz wurde der Maiswurzelbohrer ebenfalls eingeschleppt. Im Herbst 2003 wurde der Schädling bei

Basel und im Juli 2005 bei Maastricht gefunden, dann auch in Bayern und Nordrhein-Westfalen. Seit 2011 ist er in der Oberrheinebene großflächig verbreitet. Der Maiswurzelbohrer gehört zu den Blattkäfern (Familie



Abb. 43. Larve des Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera*); [M. E. Rice](#), mit Genehmigung des Autors.

Chrysomelidae), zu denen auch andere bekannte Schädlinge wie z. B. der Kartoffelkäfer zu rechnen sind. Die etwa 5-6 mm langen Käfer haben einen dunklen Kopf, einen gelben Halsschild und schwarze Deckflügel mit seitlich gelegenen gelben Streifen. Die winzigen ovalen, weißen Eier sind lediglich etwa 0,1 mm groß. Junge Larven sind etwa 3 mm lang. Ausgewachsen erreichen sie eine Länge von 15 mm. Die Käfer erscheinen gewöhnlich Anfang Juli. Sie bleiben zunächst im Feld, in dem sie sich entwickelt haben, können dann aber aktiv oder durch Windverfrachtung weiterwandern. Aufgrund der bisherigen Verbreitung in Europa weiß man, dass sie ihr Areal jährlich um 40 - 80 km ausdehnen können.

Die Nahrung bilden vor allem Pollenkörner und Narbenfäden der weiblichen Infloreszenzen. Käfer kann man bis zum ersten Frost finden, doch ist der Großteil bis Ende September verschwunden. Die Weibchen legen 300 - 400 Eier in den Boden ab, wo sie den Winter überdauern.

Die Larven erscheinen gewöhnlich im Mai und Juni. Die Verpuppung dauert nur wenige Tage, dann schlüpft der Käfer aus und arbeitet sich zur Bodenoberfläche vor. Die Larven (Abb. 43) sind weitaus schädlicher als die Käfer. Die Junglarven fressen zunächst an Haarwurzeln, spätere Stadien dann auch an größeren Wurzeln (Abb. 44). Ähnlich den Maiszünslerlarven, die den Stengel befallen, bohren sie sich auch gerne in die Wurzeln ein. Durch den Fraß werden Aufnahme und Transport von Nährstoffen zu den oberirdischen Teilen behindert, sekundäre Pilzinfektionen werden begünstigt, und die Pflanzen neigen stark zur Lagerung. Charakteristisch ist das sogenannte "Gänsehals-symptom", wobei sich die Pflanzen nach anfänglicher Lagerung wieder aufrichten, wodurch die Stengel eine gekrümmte Form bekommen, ähnlich einem Gänsehals. Die einfachste und wirksamste Bekämpfungsmethode ist der Fruchtwechsel von Mais und einer Folgefrucht im 2. oder im 3. Jahr. Da die Larven des Maiswurzelbohrers, die in Böden vorjähriger Maisflächen aus den Eiern schlüpfen, ein nur geringes Wandervermögen haben, gehen sie sehr schnell zugrunde, wenn sie nicht bald Maiswurzeln finden. Wenn Mais nicht nach Mais gebaut wird, sind keine anderen Bekämpfungsmaßnahmen erforderlich. In einigen Maisanbaugebieten der USA hat sich allerdings eine Variante des Maiswurzelbohrers herausgebildet, die Blätter und Blüten der Sojabohne frisst und ihre Eier auch in den Boden dieser Felder ablegt. Bei einer Fruchtfolge Mais - Sojabohne finden die Larven im nächsten Jahr dann Anschluss an ihre benötigte Wirtspflanze. Dies hat zur Folge, dass die gewohnte Bekämpfungsmaßnahme der Fruchtfolge in diesen Gebieten bei der vorherrschenden Rotation von Mais und Sojabohne nicht mehr wirksam ist. Etwa 20% der im Feldbau eingesetzten Insektizide werden zur Bekämpfung des Maiswurzelbohrers aufgewendet. Dennoch ist der erreichte Schutz begrenzt. Zwar lassen sich die Wurzelschäden durch den Insektizideinsatz in Grenzen halten, aber ein großer Teil der Käfer überlebt.



Abb. 44. Starke durch Larven des Maiswurzelbohrers verursachte Fraßschäden am Wurzelstock einer Maispflanze; [M. E. Rice, 2015](#), mit Genehmigung des Autors.

Obwohl der Maiswurzelbohrer verschiedene natürliche Feinde hat, gibt es zur Zeit auch keine wirtschaftlich praktikablen biologischen Bekämpfungsmöglichkeiten ([Schwabe u. a., 2010](#)).

3.1.7 Konventionelle Maiszüchtung

3.1.7.1 Allgemeine Züchtungsziele

Als allgemeine Zuchtziele gelten für den Mais wie auch für andere Getreidearten gute Standfestigkeit, hoher Kornertrag bei guter Kornabreife und gute Druscheignung, ferner Trocken- und Kältetoleranz sowie Resistenz gegen Krankheiten und Schädlinge. Für die Verwendung als Silomais, auf den in Deutschland jahrelang etwa

80% der Maisanbaufläche entfielen, sind Standfestigkeit, hoher Energieertrag und leichte Verdaulichkeit der Silage wesentliche Qualitätsmerkmale. Im nordamerikanischen Maisanbau entstehen ca. 40% der jährlichen Ernteverluste durch Wassermangel. Letzterer wird dadurch zum bedeutendsten Verlustfaktor. Die globalen Ertragseinbußen, die durch Wassermangel jährlich beim Mais verursacht werden, schätzt man auf ca. 15%. In Anbaugebieten mit wiederkehrender Trockenheit können die Verluste weitaus höher sein. Mais ist in allen Wachstumsphasen gegenüber Wassermangel empfindlich, wobei während des Blühstadiums einsetzender Wasserstress dem Kornertrag am meisten zusetzt. Ein Viertel des Gesamtverlusts kann vermutlich durch die Entwicklung trockentoleranterer Sorten ausgeglichen werden, der Rest nur durch wassersparende Anbaumethoden und künstliche Bewässerung ([James, 2015](#)). Die Landwirtschaft verbraucht über 70% der weltweit genutzten Süßwasservorräte. Während der Mensch pro Tag nur 1-2 l trinkt, verbraucht die für eine Tagesration erforderliche Tier- und Pflanzenproduktion 2000 - 3000 l Wasser. In Ländern wie China sinken die Grundwasserspiegel schnell. Die begrenzten und immer knapper werdenden Süßwasserreserven der Erde bilden eines der größten Hindernisse der Steigerung der Weltagrarproduktion. Seit 2013 wird in den USA ein monotransgener Hybridmais mit verbesserter Trockentoleranz im Produktionsmaßstab angebaut, welcher ein bakterielles Kälteschockprotein exprimiert.

3.1.7.2 Züchtungsmethoden

Selektion

Die systematische Auswahl von Elternpflanzen mit positiven Eigenschaften zur Saatgutgewinnung war über Jahrtausende hinweg das einzige bekannte Züchtungsverfahren. Diese schon von den indianischen Ureinwohnern Amerikas begonnene Selektion brachte im Laufe der Zeit eine beachtliche Fülle von Sorten hervor (Abb. 45, 46). Die am CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo; Internationales Zentrum zur Verbesserung von Mais und Weizen; [CIMMYT](#)) unterhaltene Sammlung von Maislinien umfasst mehr als 17'000 Sorten. Neben wenigen Hochleistungslinien, auf die sich der großflächige Maisanbau in Industrie- und Entwicklungsländern zunehmend beschränkt, existieren in ländlichen Gebieten Mittelamerikas und Mexikos noch zahlreiche Landrassen. Ihre Erhaltung wird als wichtig angesehen, da nur dann die genetische Vielfalt der Pflanze als Basis künftiger Züchtungen erhalten bleibt. Im Hinblick auf den Nutzungszweck ist beim Körnermais eine Typisierung nach Kornmerkmalen sinnvoll, wobei sich die einzelnen Korntypen nach Korngröße und Kornform, hauptsächlich aber durch die Beschaffenheit des Endosperms unterscheiden. Beim Zahnmais liegt zwischen den hornigen Seiten weiches Nährgewebe. Diese mehligte Stärke trocknet bei der Reife ein, was zu der charakteristischen Einsenkung an der Kornspitze führt. Beim Hartmais ist der weiche Mehlkörper rings von einer hornigen Schicht umgeben. Betrachtet man den Anbau, so hat Zahnmais die größte wirtschaftliche Bedeutung. In Europa findet man in der Regel Kreuzungen zwischen Zahn- und Hartmaisformen. Es gibt neben den genannten zahlreiche weitere Korntypen.



Abb. 45. Die Ähren vermitteln einen Eindruck von der Vielfalt der beim Mais bekannten Mutationen ([USDA, 2016](#))

und Mexikos noch zahlreiche Landrassen. Ihre Erhaltung wird als wichtig angesehen, da nur dann die genetische Vielfalt der Pflanze als Basis künftiger Züchtungen erhalten bleibt. Im Hinblick auf den Nutzungszweck ist beim Körnermais eine Typisierung nach Kornmerkmalen sinnvoll, wobei sich die einzelnen Korntypen nach Korngröße und Kornform, hauptsächlich aber durch die Beschaffenheit des Endosperms unterscheiden. Beim Zahnmais liegt zwischen den hornigen Seiten weiches Nährgewebe. Diese mehligte Stärke trocknet bei der Reife ein, was zu der charakteristischen Einsenkung an der Kornspitze führt. Beim Hartmais ist der weiche Mehlkörper rings von einer hornigen Schicht umgeben. Betrachtet man den Anbau, so hat Zahnmais die größte wirtschaftliche Bedeutung. In Europa findet man in der Regel Kreuzungen zwischen Zahn- und Hartmaisformen. Es gibt neben den genannten zahlreiche weitere Korntypen.

Hybridenzüchtung

Kreuzt man zwei Inzuchtlinien und vergleicht dann die erhaltenen Bastarde mit ihren Eltern, so stellt man häufig fest, dass erstere nach Ertrag und anderen Merkmalen den Eltern überlegen sind. Dieses dem Pflanzenzüchter als Heterosis bekannte Phänomen ist beim Mais besonders ausgeprägt. Es ist die Grundlage der Hybridenzüchtung, die beim Mais seit etwa Mitte der dreißiger Jahre des vergangenen Jahrhunderts mit großem Erfolg betrieben wird. Die Erträge des Anbaus von Hybridsaatgut sind so hoch, dass damit in den letzten 50 Jahren eine mehr als 4-fache Ertragssteigerung erzielt werden konnte. Die Hybridenzüchtung ist beim Mais besonders leicht. Man pflanzt zwei Inzuchtlinien nebeneinander und entfernt bei einer Linie manuell die männlichen Blütenstände, bevor der Pollenflug beginnt. Eine Selbstbe-

fruchtung dieser Linie ist dann ausgeschlossen. Beim Anbau von Hybridsaatgut kann der Kornertrag der Hybriden nicht wieder als Saatgut verwendet werden, weil es in den Folgegenerationen durch sexuelle Rekombination zu einer Aufspaltung der Merkmale gemäß den Mendelschen Vererbungsregeln kommt und hierbei die Erträge wieder sinken. Hybridsaatgut muss deshalb ständig vom Züchter nachgeliefert werden. Die

Entwicklung für die Hybridenzüchtung geeigneter Inzuchtlinien verlangt zudem einen mehrjährigen Selbstungsprozess, der sich meist über 8 - 10 Generationen erstreckt. Anschließend müssen die besten Inzuchtlinien gekreuzt werden, um so die besten Kombinationen zu ermitteln. Die hohen Erträge, welche der Anbau von



Abb. 46. Süßmais (Wikipedia).

Hybridsaatgut liefert, gleichen diese Nachteile bei weitem aus. Vor allem bei quantitativen Merkmalen wie Korn- und Energieertrag wird die konventionelle Hybridenzüchtung auch künftig in der Maiszüchtung eine wichtige Rolle spielen. Wesentlich leistungsfähiger wurde die Hybridenzüchtung durch Aufnahme moderner molekularbiologischer Methoden. So gibt es verschiedene molekulare Markierungstechniken, mit denen sich einzelne Gene, Chromosomenabschnitte oder Genotypen schnell und einfach identifizieren lassen. Diese Verfahren ermöglichen schon am Keimling die Erkennung von Merkmalen, die erst an der reifen Pflanze sichtbar werden und/oder wie Krankheits- und Stressresistenzen im Feld nur schwer zu beobachten sind. Bei polygenen (von mehreren Genen beeinflussten) Merkmalen erleichtern sie die Identifizierung der auf das Merkmal wirkenden Gene. Kreuzungsprogramme werden dadurch vereinfacht,

und die Generations- und Züchtungszyklen werden wesentlich beschleunigt. Die Hybridenzüchtung ist ein unentbehrliches Werkzeug zur Entwicklung von produktionstauglichem Biotechmais. Die zahlreichen Maisgenotypen unterscheiden sich nicht nur durch Gestalt- und Ertragsmerkmale sondern auch hinsichtlich ihrer Tauglichkeit für die Gewebekultur und in ihrem Regenerationsvermögen. Transformationsexperimente gelingen bisher nur mit wenigen besonders gut regenerierenden Linien. Zur Produktion von Biotechmais werden zunächst gut regenerierende Genotypen mit den gewünschten Nutzgenen transformiert. Diese werden anschließend mit konventionellen Hochleistungslinien gekreuzt, bis schließlich reinerbige transgene Hochleistungslinien erhalten werden, die zur Produktion von transgenem Hybridsaatgut geeignet sind.

Aus Kreuzungen reinerbiger Linien mit dominanten Resistenzmerkmalen hervorgegangene Hybriden der ersten Filialgeneration (F_1) sind untereinander gleich und zeigen die Merkmale beider Eltern. Da die bekannten Resistenzgene nicht miteinander wechselwirken, haben die Bastarde keine neuen, bei keinem Elternteil vorhandenen Eigenschaften. Deshalb verlangen die meisten Anbauländer vor der Zulassung dieser Sorten keine weiteren Zulassungsprüfungen.

3.2 Maisproduktion und Verwertung der Ernte

3.2.1 Weltproduktion

Mais ist die weltweit meistangebaute Getreideart. In der Anbausaison 2012 sind auf einer Fläche von 177 Millionen ha weltweit 875 Mio. t Mais geerntet worden, wovon der Großteil als Nahrungs- und Futtermittel diente. Der Rest entfällt auf verschiedene industrielle Anwendungen wie die Produktion von Bioethanol und Stärke. Mais steht nach Weizen und Reis an dritter Stelle der weltweiten Getreideproduktion. Den kommerziellen Maisanbau findet man in über 100 Ländern. Hauptproduzent und größter Exporteur sind die USA. Der wirtschaftliche Wert der US-amerikanischen Jahresernte liegt bei 87 Mrd. USD. Dort werden 30% der Welternte (354 Mt) produziert. Es folgen China (218 Mt), Brasilien (81 Mt) die EU (65 Mt), und Argentinien mit 32 Mt (Tab. 12). Weltweit gibt es ca. 200 Millionen Maisbauern. Fast alle leben in den Entwicklungsländern. Das Saatgut ist zu 2/3 Hybridsaatgut. Der Rest wird von den Bauern selbst erzeugt. Hauptursache der Ausdehnung des Maisanbaus ist die Proteinunterversorgung der wachsenden Weltbevölkerung, welche den Bedarf an Fleisch und Fleischprodukten steigert und damit die Nachfrage nach Futtermitteln.

Produzent	Ertrag (Mt)
USA	354
China	218
Brasilien	81
EU-27	65
Argentinien	32
Ukraine	31
Mexiko	23
Indien	23
Ukraine	31
Südafrika	12
Kanada	14

Tab. 12. Jahresernte 2013 der 10 größten Maisproduzenten ([FAO-STAT, 2016](#)).

Der Anbau von herbizid- und/oder insektenresistentem Biotechmais ist seit Beginn der Kommerzialisierung stetig ausgedehnt worden. Transgener Mais mit kombinierter Herbizid- und Bt-Resistenz wurde 2004 auf 6,5 Mha angebaut, vor allem in den USA und Kanada. 2012 lag das gesamte Anbauvolumen von Biotechmais bei 55,1 Mha, das entspricht 31% der globalen Maisanbauflächen. Nach Anbaufläche ist Mais damit nach der Sojabohne die zweitwichtigste Biotechpflanze.

Wegen der Ausweitung der Maisproduktion und deshalb, weil die Kommerzialisierung von Biotechmais, bedingt durch die schwierigere Transformationstechnik, später begann als bei anderen Biotechpflanzen, erwartet man beim Mais künftig die höchsten Zuwachsraten. Der Anbau verteilte sich im wesentlichen auf 8 Länder: USA, Argentinien, Kanada, Südafrika, Spanien, Philippinen, Uruguay und Honduras. Die EU ließ bis Ende 2004 17 herbizid- und insektenresistente Sorten zu. Größere Anbauflächen gibt es bisher nur in Spanien, wo 2004 auf 58'000 ha insektenresistenter Mais angebaut wurde. In den meisten EU-Ländern wird der Anbau von Biotechmais durch nationale Regelungen blockiert.

3.2.2 Verwertung der Ernte

3.2.2.1 Mais als Tierfutter

Mehr als die Hälfte (66%) der Weltproduktion wird als Silomais, Grünfütter-Mais oder Körnermais an Tiere verfüttert. In der EU sind 1994 2,9 Millionen Tonnen Feldmais als Lebensmittel oder Lebensmittelbestandteile verbraucht worden gegenüber 21 Millionen Tonnen als Tierfutter. Ein ha Körnermais, zu Schweinefutter verarbeitet, genügt, um 30 - 35 Schweine zu mästen. In Deutschland sind lange Zeit rund 80% der Maisernte zur Silagegewinnung eingesetzt worden. In den USA werden 10 - 12% der Maisernte zu Silofutter verarbeitet, das vor allem der Anzucht von Kälbern dient. Silierter Mais bildet für die Tiere eine gern angenommene Futterquelle. Die ganze Pflanze enthält etwa das Eineinhalbfache der im Korn gespeicherten Nährstoffe, wovon bei der Silierung mehr als 90% erhalten bleiben. Ein ha Silomais deckt den Jahresgrundfutterbedarf für 3 bis 4 Kühe. Maiskörner enthalten Stärke, Zellulose, Eiweiß, Zucker, Mineralstoffe, Vitamine und Wasser in unterschiedlichen, von der Sorte und den Wachstumsbedingungen abhängigen Mengenverhältnissen. Die typische Analyse liefert 82% Kohlenhydrate, 11% Fasern, 6 - 13% Proteine, 3-6% Fette, 1-4% Mineralstoffe, 7 - 23% Wasser und verschiedene Vitamine. Maiskörner enthalten nur sehr wenig Calcium. Phosphor ist in gebundener Form als Phytinsäure (Inositolhexakisphosphat) vorhanden, die bei Pflanzen als Phosphatspeicher weit verbreitet, aber nur von Wiederkäuern verwertbar ist. Die Aminosäuren Lysin und Tryptophan kommen nur in geringen Mengen vor. Vermischt mit Sojamehl liefert Mais ein Futtermittel, dessen Zusammensetzung den Bedürfnissen der meisten Nutztiere Rechnung trägt. Zur Verfütterung an Schweine wird Mais mit den Vitaminen A, D E, K, B12, Riboflavin, Niacin und Pantothersäure supplementiert. Für Wiederkäuer genügt ein Zusatz der

Vitamine A, D, E und K. Ferner werden bei der Futtermittelherstellung Calcium und, für Nichtwiederkäuer, das Enzym Phytase zugesetzt, um den Calciummangel auszugleichen bzw. das in der Phytinsäure gebundene Phosphat verfügbar zu machen. Mais-Sojamehl-Mischungen für die Geflügel- und Schweinezucht sind charakteristischerweise lysindefizient und müssen zum optimalen Wachstum der Tiere mit Lysin angereichert werden, welches meist durch Fermentierung mit *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium lactofermum* gebildet und als Lysinmonohydrochlorid oder Lysinsulfat zugesetzt wird. Die Beigabe von Lysin zu Futter- und Lebensmitteln in ernährungsphysiologisch sinnvoller Dosis ist nach bisherigen Erfahrungen als unbedenklich anzusehen.

3.2.2.2 Mais zur menschlichen Ernährung

Süßmais (Zuckermais) wird meist gekocht als Gemüse oder gegart vom Kolben verzehrt. In der EU wurden davon 1995 419'000 t verbraucht. Beim Feldmais (Körnermais) ist der Anteil, welcher unmittelbar oder in Form ausschließlich aus Mais hergestellter Lebensmittel (Popcorn, Maisflocken) verzehrt wird, gering. Der größte Teil wird zu Maisstärke weiterverarbeitet. Aus dem Keimlingsgewebe wird Maisöl extrahiert. Man findet Maisstärke in Backwaren, Babynahrung, Saucen, Suppen und vielen anderen Lebensmitteln. Ein großer Teil wird zu Süßungsmitteln (Stärkesirup) oder auch zu Ethanol vergoren. Maisöl dient u. a. zur Herstellung von Margarine, Mayonnaise, als Salatöl oder zum Backen und Frittieren.

3.2.2.3 Mais als Industriepflanze

Stoffliche Verwertung

Die Industrie verwendet Mais zur Herstellung von Kunststoffteilen, Recyclingpapier, Farben, Textilien, Klebern und Bindemitteln, synthetischem Gummi, Kosmetika und pharmazeutischen Produkten. Zunehmendes Interesse gewinnt die Nutzung von Biotechmais als Produktionsplattform für pharmazeutische Proteine und Spezialchemikalien. Der Mais bietet hier gegenüber anderen Kulturpflanzen deutliche Vorteile wie die hohe Biosicherheit, die ausgebaute agrarische Infrastruktur, zuverlässige Gewebekultur- und Transformationsverfahren und die für C₄-Pflanzen typische effiziente Biomasseproduktion. Maiskörner sind gute Reaktionsbehälter. Sie können nicht nur die Proteinsynthese durchführen sondern auch, ähnlich wie tierische Zellen, Glykosylierungsreaktionen, die notwendig sein können, um im Mais gebildete heterologe Proteine in die biologisch aktive Form zu bringen. Sie sind zudem groß, haben einen hohen Endospermanteil und enthalten keine aktiven Proteasen. Der Samen ist ein natürliches Proteinspeicherorgan, und Maisproteine sind im intakten entwässerten Korn bei Raumtemperatur über mindestens 6 Jahre stabil. Heute kann nahezu jedes Protein im Mais Korn extrahiert und anschließend extrahiert und mit hoher Ausbeute gereinigt werden. So können die monoklonalen anti-HIV-Antikörper 2F5 und 2G12 mit 90% Ausbeute und 95% Reinheit mit einer modifizierten Affinitätschromatographie gewonnen werden. Beispiele in Biotechmais produzierter Industrieenzyme für nichtmedizinische Anwendungen sind Laccase des Pilzes *Trametes versicolor*, Cellulase aus dem Bakterium *Acidothermus cellulolyticus*, Phytase aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* und β -Glucuronidase von *E. coli*. Mehrere im Mais gebildete für die Tiermedizin entwickelte Impfstoffe gegen Durchfallerkrankungen, Gastroenteritis und die atypische Geflügelpest (Newcastle-Krankheit) werden bereits im Tierversuch getestet. Ein gegen Tollwut gerichteter monoklonaler Antikörper befindet sich im Laborversuchsstadium ([Naqvi u. a. 2011](#)).

Energetische Verwertung - Bioethanolproduktion

Ein wachsender Teil der globalen Maisernte wandert in die industrielle Bioethanolproduktion. Motor dieser Entwicklung sind die USA, wo die Produktion von Bioethanol durch Regierungsprogramme stark gefördert wird. Man will so dem steigenden Energiebedarf Rechnung tragen und die Wirtschaft gleichzeitig unabhängiger von Ölimporten machen. Die US-amerikanische Bioethanolproduktion ist zwischen 2001 und 2006 von weniger als 2 Mrd. Gallonen/Jahr auf über 7 Mrd. Gallonen/Jahr gesteigert wurde. Dies sind über 5% des amerikanischen Benzinverbrauchs (140 Mrd. Gallonen/Jahr). Produktionskapazitäten von 6 Mrd. Gallonen /Jahr befanden sich 2007 bereits im Bau. 1 Gallone entspricht 3,78 l. In den USA wird Bioethanol fast ausschließlich aus Mais gewonnen. 44% der amerikanischen Maisernte wanderten 2014 in den Tank ([USDA, 2016](#)). Der Ausbau der Bioethanolproduktion wird von einer stetigen Verbesserung des Herstellungsprozesses begleitet und vorangetrieben. Während aus einem Bushel (25,40 kg) Mais vor einigen Jahren 2,5 - 2,6 Gallonen Treibstoff gewonnen werden konnten, sind es heute bereits 2,8 Gallonen. Wesentliche Ursachen dieser Effizienzsteigerung sind die Verbesserung der Stärkeumwandlung in Ethanol und die Züchtung neuer speziell auf die Alkoholproduktion zugeschnittener Maishybriden.

Neue in den USA errichtete Bioethanolfabriken arbeiten fast alle nach dem Trockenmahlverfahren. Das ganze Maiskorn wird dabei zunächst zu einem groben Mehl vermahlen, welches anschließend mit Wasser versetzt und zu einem wässrigen Brei, der Maische verrührt wird. Die anschließende Umwandlung von Maisstärke in Ethanol ist ein mehrstufiger Prozess, dessen erster Schritt die enzymatische Hydrolyse des Stärkemoleküls zu einfachen Zuckern ist. Sie wird durch die in der Natur verbreiteten α -Amylasen katalysiert. Diese Enzyme katalysieren die Stärkehydrolyse, indem sie die inneren α -1,4-glukosidischen Bindungen des Stärkemoleküls spalten, wobei Dextrine (Stärkefragmente im Größenbereich von 5 - 50 Glukosemolekülen), Maltose und Glucose entstehen. Nach dem α -Amylaseschritt werden der Maische Glukoamylasen zugegeben um den Abbau der Dextrine zu Glucose zu vollenden. Die anschließende Zugabe von Hefekulturen leitet die Alkoholgärung ein, worauf der Alkohol durch Destillation entfernt wird. Der Rückstand (Schlempe) kann fast vollständig zu Tierfutter und Industrierohstoffen verarbeitet werden. Auch das bei der Alkoholgärung gebildete Kohlendioxid ist industriell verwertbar und dient u. a. der Herstellung von Trockeneis.

Die Stärkehydrolyse läuft bei niedrigen Calciumionenkonzentrationen und hohen Temperaturen wesentlich schneller ab. Letztere werden aber von pflanzlichen und tierischen α -Amylasen nicht vertragen. Der Maische werden deshalb thermostabile mikrobielle Amylasen zugesetzt. Dies kann vermieden werden, wenn Event-3272-Mais als Ausgangsmaterial verwendet wird. Dieser von der Syngenta AG entwickelte transgene Mais bildet im Korn eine hitzestabile α -Amylase, welche es möglich macht, den ersten Schritt der Stärkehydrolyse ohne Zusatz bakterieller thermostabiler α -Amylasen bei Temperaturen um 90 °C durchzuführen.

Von 1974 bis 2005 sind die Preise für Grundnahrungsmittel auf dem Weltmarkt um 75% gefallen und seit Mitte 2005 stark angestiegen. Der Maispreis hat sich zwischen 2005 und 2008 verdreifacht ([Naqvi u. a., 2011](#)). Der Anstieg war mit der Ausweitung der Bioethanolproduktion korreliert, was eine lebhafte und noch andauernde Diskussion über deren Einfluss auf die Nahrungsmittelpreise auslöste. Die OECD kommt in einer 2008 erschienenen Stellungnahme zu dem Schluss, dass dieser Einfluss zwar signifikant ist, aber nicht überschätzt werden sollte und prognostiziert für den Zeitraum von 2013 - 2017 durch die Bioethanolproduktion bedingte Preissteigerungen bei Weizen, Mais und Pflanzenölen von jeweils 5%, 7% und 19% ([OECD, 2008](#)). Energetisch gesehen ist die Produktion von Maisethanol unwirtschaftlich und kann nur einen marginalen Teil der fossilen Treibstoffe ersetzen ([1.3.3](#)).

3.3 Biotechmais

Die Datenbank des Center for Environmental Risk Assessment ([CERA, 2015](#)) lieferte 2015 59 Einträge zum Anbau zugelassener Biotechmaissorten. Davon sind 14 Monotransgene mit nur einem agronomischen Merkmal. 5 davon sind tolerant gegenüber Glyphosat- oder Glufosinat-Totalherbiziden. 6 sind resistent gegen Schmetterlinge der Maiszünslergruppe oder gegen den Maiswurzelbohrer. Eine Linie ist trockentolerant, und zwei tragen Stoffwechselmodifikationen. Von letzteren hat eine einen erhöhten Gehalt an freiem Lysin im Samen. Die andere produziert eine hitzebeständige α -Amylase. Von den verbleibenden 45 Sorten sind 4 nicht transgen und tolerant gegenüber Imidazolinon- oder Cyclohexanon-Herbiziden. Man erhielt sie durch Selektion somaklonaler Varianten - Mutanten, welche in pflanzlichen Gewebekulturen entstehen können - oder chemische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS). Die übrigen Sorten sind di- oder oligotransgen und tragen Kombinationen mehrerer Merkmale. Sie entstanden größtenteils durch konventionelle Kreuzungen. Sie sind Stapelhybriden (stacked hybrids), welche mehrere „gestapelte“ Funktionsgene tragen. Die komplexeste resultiert aus einer Mehrfachkreuzung 4 verschiedener transgener Linien (MON89034, TC1507, MON88017 und DAS-59122-7). Sie exprimiert 8 Transgene und ist nicht nur tolerant gegen Glyphosat- und Glufosinat-Totalherbizide sondern auch resistent gegenüber allen wirtschaftlich bedeutsamen Schadinsekten des Maisanbaus (Maiszünsler und verwandte Schmetterlinge, Maiswurzelbohrer).

3.3.1 Monotransgene Sorten

Monotransgene Sorten exprimieren nur ein für die Nutzung der Sorte bedeutsames Transgen. Kommerziell genutzt werden herbizidresistente Sorten, insektenresistente Sorten und solche mit Stoffwechselmodifikationen. Seit 2013 ist MON87460, der erste trockentolerante Biotechmais, auf dem nordamerikanischen Markt. Ältere monotransgene Sorten wie MON810 oder EV176 werden vor allem in Ländern, die schon früh mit dem Biotechpflanzenanbau begonnen haben, heute kaum noch angebaut und sind fast vollständig durch moderne Stapelsorten ersetzt.

3.3.1.1 DKB-89790-5

Zulassung

DKB-89790-5 (Synonyme B16, DLL25) der Firma Dekalb Genetics war eine der ersten für den kommerziellen Anbau zugelassenen gegen die Glufosinatherbizide resistenten transgenen Maislinien. Mehrere weitere sind auf dem internationalen Saatgutmarkt. Zwischen 1996 und 2003 wurde B16 in USA, Kanada, Japan, Philippinen, Taiwan, Japan zur Verwendung als Futter- und/oder Nahrungsmittel zugelassen.

Molekulargenetik

B16 wurde durch biolistische Transformation des Maisgenotyps A188xB73 erhalten, einer Kreuzung zweier konventioneller Maisinzuchtlinien. Anschließend kreuzte man die erhaltenen transformierten Pflanzen mit konventionellen Hochleistungslinien. B16 exprimiert zwei bakterielle Gene. Die Ammoniumglufosinattoleranz von B16 beruht auf der Expression des *bar*-Gens, das aus dem im Boden verbreiteten Actinomyceten (Strahlenpilz) *Streptomyces hygroscopicus* stammt und Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) kodiert. PAT katalysiert die Acetylierung von Phosphinothricin und wandelt dieses dadurch in eine inaktive Verbindung um. Das *bar*-Gen wird unter Kontrolle des CaMV35S-Promoters konstitutiv exprimiert. Seine DNA-Sequenz wurde optimiert für die Expression in Pflanzenzellen, jedoch ohne dass die Aminosäuresequenz des PAT-Enzyms dabei verändert wurde. Nicht nur der Pilz sondern auch das freie Enzym kommen natürlicherweise im Boden vor. Im transgenen Mais hat das PAT-Enzym eine Doppelfunktion. Einmal erzeugt es die Feldtoleranz der Pflanzen gegenüber den Phosphinothricinherbiziden. Zum anderen dient es in der Gewebekulturtechnik als Selektionsmarker zur selektiven Vermehrung mit dem *bar*-Gen transformierter Pflanzenzellen und Keimlinge. Das zweite von B16 und seinen Kreuzungsnachkommen exprimierte Transgen ist das β -Lactamasegen (*bla*) von *E. coli*. Die β -Lactamase vermittelt Resistenz gegenüber mehreren Antibiotika, welche einen β -Lactamring enthalten, darunter Penicillin und Ampicillin. Man benötigt dieses Gen bei den Transformationsprozeduren zur Selektion transformierter Bakterien. *bla* wird von einem bakteriellen Promoter gesteuert und wird deshalb in Pflanzen nicht aktiv. B16 exprimiert nur ein Fremdprotein, PAT, und zwar in allen Organen. Am höchsten ist die Expression in den Blättern mit 1 - 4,6 μ /g Frischgewicht, was 0,1 - 0,5% des Gesamtproteingehalts der Blätter entspricht. In den reifen Körnern ist PAT nicht mehr nachweisbar. Wie molekularbiologische Analysen zeigen, wurde bei der Transformation nur eine *bar*-Kopie ins Maisgenom eingebaut. Dies ist insofern erwähnenswert als

das biolistische Transformationsverfahren dazu führen kann, dass mehrere Kopien der übertragenen DNA ins Genom des Empfängers aufgenommen werden. Über 12 Maisgenerationen verfolgte Kreuzungsanalysen zeigen, dass das eingeführte *bar* stabil bleibt und nach den Mendelschen Regeln vererbt wird. Auch die Expression von *bar* bleibt über mehrere Generationen stabil erhalten.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale. Vor der Kommerzialisierung ist B16 in langjährigen Feldversuchen seit 1991 in den USA, seit 1994 in Kanada und später auch in Argentinien getestet worden. Viele agronomische Merkmale der Sorte wurden dabei untersucht und mit denen konventioneller Sorten verglichen. Statistisch signifikante Unterschiede sind nicht gefunden worden. Wegen seiner hohen Spezifität für Phosphinothricin verändert das PAT-Enzym den Maisstoffwechsel nicht und führt nach heutigem Wissen nicht zur Bildung neuer biochemischer Verbindungen. Mit anderen Worten: B16 unterscheidet sich vom konventionellen Mais nur durch den Besitz von *bar* und die Resistenz gegen Phosphinothricinherbizide.

3.3.1.2 NK603

Zulassung

Der von Monsanto zur Verwendung in Futter- und Lebensmitteln entwickelte Biotechmais NK603 (Synonym MON-ØØ6Ø3-6) toleriert Glyphosat als Wirkstoff enthaltende Totalherbizide (Roundup® u. a.). Er ist in zahlreichen Ländern zum Anbau und/oder zur Verwertung in Futter- und Lebensmitteln zugelassen, erstmals in den USA (2000), Kanada und Japan (2001) und zuletzt in Uruguay (2011).

Molekulargenetik

Die Glyphosatoleranz von NK673-Biotechmais beruht auf der Expression zweier Transgenen, welche biolistisch in die konventionelle Inzuchtmaislinie LH182xB73 übertragen wurden. Beide Gene kodieren eine für die Expression in Pflanzen sequenzoptimierte Form der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS) des Agrobakterienstamms CP4 (CP4-EPSPS). Das Enzymprotein besteht aus einer einzigen Peptidkette mit 455 Aminosäuren. Auch Pflanzen bilden EPSPS, welche sie zur Synthese aromatischer Aminosäuren benötigen. Glyphosat wird selektiv von der pflanzeigenen EPSPS gebunden, wodurch das Enzym inaktiviert wird. Die modifizierten Formen der CP4-EPSPS haben eine stark verringerte Bindungsfähigkeit (Affinität) für Glyphosat und machen die Pflanze dadurch gegenüber Glyphosat unempfindlich. Die Expression der EPSP-Synthasen schützt vor der Schädigung durch glyphosathaltige Herbizide. Es sind bei den beiden Genen verschiedene Steuersignale verwendet worden, um eine gute Expression im pflanzlichen Gewebe zu erreichen. Die Sequenz der ersten EPSPS-Genkassette beginnt mit dem Promoter eines Actingens aus dem Reis, die des zweiten mit einem optimierten CaMV35S-Promoter. Bei beiden EPSPS-Genen folgt die Sequenz eines Chloroplasten-transitpeptids und anschließend die kodierende Sequenz der CP4-EPSP-Synthase. Das Transitpeptid bewirkt, dass die mit ihm verknüpfte EPSPS nach ihrer Synthese an den zellulären Ribosomen in die Chloroplasten transportiert wird, wo ihr Wirkungsort ist. Die beiden Transgene liegen unmittelbar hintereinander auf einem 6706 bp langen DNA-Fragment, das aus einem Plasmid herausgeschnitten wurde. Die Input-DNA trägt keine Antibiotikaresistenzmarker oder andere bakterielle DNA-Sequenzen. Transformierte Pflanzenzellen selektierte man in der Gewebekulturphase in Gegenwart von Glyphosat im Kulturmedium. Mit den üblichen biochemischen und bioinformatischen Methoden der Genom- und Genanalyse findet man im Genom der Transformanten eine einzige vollständige Kopie der *input*-DNA. Die Insertion erzeugt an der Insertionsstelle keine neuen Leserahmen, welche zur Expression unerwarteter neuer Proteine führen könnte. Am 3'-Ende des Inserts folgt ein 217 bp langes Fragment des Reis-Actinpromoters und ein 305 bp langes Stück Chloroplasten-DNA, welches aus dem Plastom der transformierten Zelle stammt. Die Sequenz des EPSPS-Gens der zweiten Genkassette der Input-DNA unterscheidet sich um 2 Nukleotide von der Insertionssequenz, was zum Austausch von Leucin durch Prolin an Position 214 der Peptidkette der EPSPS führt. All diese Anomalien sind funktionslos und verändern den Phänotyp der Transformanten nicht. In der Nachkommenschaft der primären Transformanten vererbt sich die Glyphosatoleranz wie ein einzelner dominanter Mendelfaktor und ist über mindestens 6 Generationen stabil. Nach an verschiedenen Feldstandorten unternommenen Anbauversuchen liegt die mittlere immunologisch mit CP4-EPSPS-Antikörpern gemessene Konzentration des EPSPS-Proteins bei 25 µg im Grünfutter und bei 11 µg im Korn.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

NK603 unterscheidet sich hinsichtlich Ertrag, Erntequalität und anderen agronomischen Eigenschaften nicht von konventionellem Mais. Quantitative Analysen der Kornzusammensetzung zeigen nur bei 6 Aminosäuren

(Alanin, Arginin, Glutaminsäure, Histidin, Leucin, Methionin) geringe statistisch signifikante Unterschiede zu konventionellen europäischen, nicht amerikanischen, Maissorten, die im natürlichen Varianzbereich konventioneller Maislinien liegen. Fütterungsversuche mit verschiedenen Nutztieren zeigen die Gleichwertigkeit von NK603-Mais und konventionellem Mais. Das einzige Merkmal, welches NK603 von konventionellem Mais unterscheidet, ist die Glyphosatoleranz.

3.3.1.3 EXP1910IT

Die Linie EXP1910IT von Syngenta ist ein Beispiel einer imidazolinonresistenten Sorte, die durch chemisch induzierte Pollenmutagenese mit Ethylmethansulfonat erhalten wurde. Im Jahre 1996 wurde dieser Mais in Kanada für den Anbau zugelassen. Um die Mutation zu erhalten, wurde zunächst normaler Maispollen mit EMS behandelt. Der mutagenisierte Pollen diente zur Bestäubung einer konventionellen Elternlinie. In deren Nachkommenschaft wurde dann nach Pflanzen gesucht, die in Gegenwart von Imazethapyr wachsen konnten. Ihre molekularbiologische Analyse und die Sequenzierung des AHAS-Gens ergaben, dass durch eine Punktmutation Serin 21 des Enzymproteins gegen Asparagin 21 ausgetauscht worden war. Kreuzungsdaten zeigten die genetische Stabilität des Merkmals und seine Vererbung nach den Mendelschen Regeln. Die Mutante besitzt weder fremde DNA noch produziert sie neue Proteine. Außerdem verändert die Mutation die biochemischen Eigenschaften der Acetohydroxysäuresynthase nicht, abgesehen von der Unempfindlichkeit gegen Imazethapyr. Die Sorte hat die gleichen Eigenschaften wie konventioneller Mais, bis auf die Imidazolinonresistenz.

3.3.1.4 MON810

Zulassung

Der unter dem Handelsnamen Yieldgard® von der amerikanischen Monsanto Company vertriebene Bt-Mais MON-00810-6 (MON810) gehört zu den ersten für den kommerziellen Anbau entwickelten Bt-Maissorten und kann wie B16 als typischer Vertreter der ersten Generation für den kommerziellen Anbau freigegebener transgener Maislinien gelten. Die erstmalige Zulassung erfolgte 1995/1996 in den USA und später in mehr als einem Dutzend weiterer Länder außerhalb und innerhalb der EU (Kanada 1997, Argentinien 1998, EU 1998, China 2004). Innerhalb der EU wurde er in größerem Umfang bisher nur in Spanien kultiviert und hat dort den unten beschriebenen von 1998 bis 2003 angebauten EV176-Mais von Syngenta ab 2003 ersetzt..

Molekulargenetik

MON810 entstand durch biolistische Transformation des Maisgenotyps Hi-II mit einer Mischung von zwei Plasmiden. Eines der beiden Plasmide trug ein verkürztes synthetisches *cryIAb*-Gen, welches ursprünglich aus einem *Bacillus-thuringiensis*-Stamm (subspecies *kurstaki*) isoliert worden war und dessen Proteinprodukt mit der insektiziden Region des bakteriellen Bt-Gens identisch ist. Der Promoter ist ein verbesserter CaMV35S-Promoter. In die Promotersequenz wurde ein *hsp70*-Intron eingefügt, ein aus dem Maisgenom isoliertes DNA-Element, von dem bekannt ist, dass es als Expressionsverstärker wirkt. Das zweite Plasmid trug 2 aus Bakterien stammende Gene, *cp4* und *gox*, welche den transformierten Pflanzen Resistenz gegen Glyphosatherbizide verleihen und als Selektionsmarker verwendet wurden, um transformierte Pflanzenzellen und Keimlinge zu selektieren. *cp4* stammt aus einem Agrobakterienstamm und kodiert eine EPSPS (s. o.), welche Glyphosat kaum bindet und deshalb gegen den Wirkstoff unempfindlich ist. *gox* ist ebenfalls bakteriellen Ursprungs. Sein Genprodukt, eine Glyphosatoxidoreduktase, wandelt Glyphosat in 2 ungiftige Abbauprodukte um, Aminomethylphosphonsäure (AMPA) und Glyoxylat. Die Expression von *gox* und *cp4* verleiht den Maispflanzen also eine doppelt abgesicherte Resistenz gegen Glyphosat. Jedes der beiden Transformationsplasmide trug außerdem ein von einem bakteriellen Promoter gesteuertes Kanamycinresistenzgen (*nptII*). Nach molekularbiologischen Analysen enthält MON810 nur eine *cryIAb*-Kopie. Die bakteriellen Markergene *cp4*, *gox* und *nptII* sind im Genom dieser Linie nicht mehr nachweisbar. Da sie in den ursprünglichen Transformanten vorhanden waren, müssen sie während des über mehrere Maisgenerationen durchgeführten Kreuzungsprozesses verlorengegangen sein, der schließlich die Maislinie MON810 hervorbrachte. MON810 ist also insektenresistent, aber nicht herbizidtolerant und besitzt auch kein Antibiotikaresistenzgen mehr. Das von MON810 exprimierte verkürzte synthetische *cryIAb* wird von einem starken konstitutiven Promoter geregelt und ist zudem für die Expression in Pflanzen sequenzoptimiert. Entsprechend hoch sind die in der Pflanze gefundenen Konzentrationen des Bt-Toxins. Im Blatt liegen sie im Mittel bei 9 µg/g Frischgewicht, im Korn bei 0,3 µg/g und im Pollen bei 0,09 µg/g. Während der Vegetationsperiode nimmt die Proteinexpression kontinuierlich ab. Die angegebenen Mengen reichen jedoch aus, um alle Maiszünlergenerationen, die im Laufe der Vegetationsperiode auftreten, wirksam zu

bekämpfen. Kreuzungsexperimente über mehrere Maisgenerationen bestätigen, dass das *cry1Ab* an einem einzigen Locus (Genort) ins Genom eingebaut wird und sich stabil wie ein einzelner Mendelfaktor vererbt. Sie zeigen auch, dass der Expressionspegel des Bt-Proteins über die Generationen erhalten bleibt. Bei einer im Jahre 2010, 10 Jahre nach dem ursprünglichen Transformationsereignis, erschienenen molekularen Analyse des Transgeninserts und seiner flankierenden Regionen mehrerer kommerzieller MON-810-Varietäten fand man keinerlei DNA-Umordnungen und keine Punktmutationen innerhalb der *cry1Ab*-Sequenz. Die Mutationsrate des Transgens ist demnach nicht höher als bei den endogenen Maisgenen ([La Paz u. a., 2010](#)).

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

MON810 ist in jahrelangen Feldversuchen in den USA und in Kanada getestet worden und unterscheidet sich von konventionellen Sorten nicht. Dies gilt für alle bekannten physiologischen Eigenschaften. Außerdem zeigt die Linie keine Anzeichen erhöhter Schädlings- oder Krankheitsanfälligkeit. Es gibt umfangreiche biochemische Analysen von Proben, die von Feldversuchen in verschiedenen Anbaugebieten in den USA und Europa stammen. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Werten konventioneller Linien, so findet man keinerlei biologisch signifikanten Unterschiede. Das einzige Merkmal, in dem sich MON810 von konventionellem Mais unterscheidet, ist die Expression des Bt-Gens und die Insektenresistenz. Die ernährungsphysiologische Gleichwertigkeit von Bt-Mais und konventionellem Mais kann zudem experimentell durch Fütterungsversuche bestätigt werden.

3.3.1.5 MON863

Zulassung

MON-00863-5 (MON863) von Monsanto war die erste transgene Maislinie, die eine gegen den Maiswurzelbohrer gerichtete Bt-Resistenz besitzt. Mehrere andere sind auf dem außereuropäischen Markt. Zum Anbau zugelassen wurde die Sorte bisher in den USA und Kanada (2003), zur Verwertung als Futter- und oder Lebensmittel in Australien (2003), China (2004), Japan (2002), den Philippinen (2003), Taiwan (2003) und der EU (2005/2006).

Molekulargenetik

MON863 exprimiert das *cry3Bb1*-Gen von *Bacillus thuringiensis*. Dieses Gen kodiert ein Toxin, gegen das der Maiswurzelbohrer empfindlich ist. Auch Cry3Bb1 ist ein δ -Endotoxin. Es wirkt nur auf Käfer, die zur Familie der *Chrysomelidae* gehören. Das Gen wurde durch biolistische Transformation in eine gewöhnliche Maisinzuchtlinie (A634) eingeführt. A634 ist eine der in den USA verbreitetsten zur Hybridenzüchtung verwendeten Inzuchtlinien. *cry3Bb1* wird von einem optimierten CaMV35S-Promoter geregelt. Um die Toxinkonzentration in der Pflanze zu erhöhen, wurden in die ursprüngliche Promotersequenz vier als Expressionsverstärker wirkende DNA-Sequenzelemente (*asn-1*) eingefügt. Auch die Sequenz von Cry3Bb1 ist modifiziert. Sie unterscheidet sich von ihrer Ursprungssequenz durch die Einfügung der Aminosäure Alanin an der zweiten Position der Peptidkette und durch den Austausch von 7 Aminosäuren. Die Sequenzoptimierung erhöht die Wirksamkeit des Toxins gegen den Maiswurzelbohrer. Cry3Bb1 wirkt gegen mehrere *Diabrotica*-Arten, darunter *Diabrotica virgifera virgifera* (western corn root worm), *Diabrotica barberi* (northern corn root worm) und *Diabrotica virgifera zea* (Mexican corn root worm). Als Selektionsmarker diente bei dieser Sorte *nptII* unter Kontrolle des CaMV35S-Promoters. Beide Gene sind nach molekularbiologischen Analysen unverletzt mit allen Expressionssignalen übertragen und ins Genom der Empfängerpflanzen integriert worden. Die beiden Transgene von MON863 vererben sich nach den Mendelschen Regeln. Die Expression bleibt stabil über mehrere Maisgenerationen. Unter dem verbesserten CaMV35S-Promoter wird das *cry3Bb1* in allen Maisgeweben exprimiert. Proteinkonzentrationsbestimmungen liefern je nach Gewebe zwischen 10 und 81 µg Bt-Toxin pro g Frischgewicht. Dies genügt, um die Maiswurzelbohrer und ihre Larven wirksam zu bekämpfen. Auch die *nptII*-Expression ist nachweisbar. Die Konzentration der Neomycinphosphotransferase beträgt maximal 1,4 µg/g.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die Auswertung der agronomischen Merkmale lässt wie schon bei den anderen Biotechmaissorten keine statistisch fassbaren Unterschiede zu konventionellen Linien erkennen. Verglichen mit diesen und chemischen Insektiziden stellt der Anbau von MON863 eine weitaus bessere Methode zu Bekämpfung des Maiswurzelbohrers dar. MON863 zeigt in Feldversuchen geringere Wurzelschäden und dadurch höhere Erträge als konventionelle Hybriden, selbst wenn diese mit registrierten Bodeninsektiziden behandelt werden. Der

Anbau von MON863 vereinfacht die Maiskultur, reduziert Kosten und Aufwand der Insektizidanwendung und schützt die Maisbauern ebenso wie die Umwelt vor den Folgen der Pestizidanwendung. Nach Schätzungen der amerikanischen Umweltbehörden betrugen die den Maisbauern in den Jahren 2003 - 2005 durch den Anbau von MON863 nach Abzug aller Mehrkosten (Lizenzgebühren u. a.) entstandenen Einkommensverbesserungen 49 Millionen USD. Für die einzelnen Betriebe bedeutet dies Mehreinnahmen von bis zu 10%.

3.3.1.6 Event 3272 (SYN-E3272-5)

Die bisher beschriebenen Genübertragungen verändern den Maisstoffwechsel nicht. Die neuen Sorten gleichen dem konventionellen Mais in allen biochemischen und physiologischen Eigenschaften und sind von diesem nur durch die Anwesenheit und Expression der Resistenzgene und den insekten- oder herbizidresistenten Phänotyp unterscheidbar. Während die Entwicklung resistenter Maislinien bereits einen recht hohen Stand erreicht hat und ihr weltweiter Anbau immer rascher ausgedehnt wird, steckt die Kommerzialisierung von Sorten mit verbessertem Ernährungswert oder neuen für industrielle Anwendungen geeigneten Inhaltsstoffen noch in den Anfängen. Wünsche an die Geningenieure zur Entwicklung von Mais und anderen Kulturpflanzen mit einem ausgewogeneren oder erweiterten Spektrum an Inhaltsstoffen gibt es viele. Zwei praxisreife Beispiele geglückter Modifizierung des Maisstoffwechsels bilden die von Syngenta für die Bioethanolproduktion entwickelte Sorte Event 3272, welche eine hitzebeständige α -Amylase bildet, und der zur Verwendung in Futtermitteln bestimmte lysinangereicherte Monsanto-Mais LY038.

Der erste biochemische Schritt der großtechnischen Herstellung von Bioethanol aus Maisstärke ist die Stärkehydrolyse durch α -Amylasen. Die Stärkehydrolyse läuft bei niedrigen Calciumionenkonzentrationen und hohen Temperaturen wesentlich schneller ab. Letztere werden aber von pflanzlichen und tierischen α -Amylasen nicht vertragen. Der Maische werden deshalb thermostabile mikrobielle Amylasen zugesetzt. Dies kann vermieden werden, wenn Event-3272-Mais als Ausgangsmaterial verwendet wird. Dieser von der Syngenta AG entwickelte transgene Mais bildet im Korn eine hitzestabile α -Amylase, welche es möglich macht, den ersten Schritt der Stärkehydrolyse ohne Zusatz bakterieller thermostabiler α -Amylasen bei Temperaturen um 90 °C durchzuführen.

Zulassung

Event 3272 war 2013 in 4 Ländern zum Anbau zugelassen. Acht weitere Länder genehmigten auch die Verwendung von Event-3272-Mais in Futter- und/oder Lebensmitteln.

Molekulargenetik

Event-3272-Mais erhielt man durch agrolistische Transformation unreifer Embryonen der konventionellen Maislinie 3272 mit einem Plasmid, welches zwei hintereinander liegende Genkassetten trägt. Die erste enthält ein optimiertes synthetisches α -Amylasegen (*amy797E*). Es besteht aus 9 Genfragmenten, welche aus den α -Amylasegenen dreier verschiedener *Thermococcus*-Bakterien stammen und hitzestabile Amylasen kodieren. Der amyasekodierenden Sequenz geht eine Signalsequenz voraus, die einem Speicherproteingen aus dem Mais (Zein) entstammt. Sie ermöglicht den Transport an den Ribosomen des Zellplasmas synthetisierter Amylasemoleküle ins endoplasmatische Reticulum. Dies ist ein weit verzweigtes Speichersystem aus Röhren, Bläschen und sackähnlichen Strukturen, welches zu den submikroskopischen Grundstrukturen aller pflanzlicher und tierischer Zellen gehört. Auch der Promoter von *amy797* stammt aus dem Zeingen des Mais. Er bewirkt die organ- und gewebespezifische Expression des Gens im Maiskorn. Die Genkassette endet mit der Terminatorsequenz des CaMV35S-Promoters. Die zweite Genkassette enthält das *pmi*-Gen aus *E. coli*. Es kodiert Phosphomannoseisomerase (PMI). Das Gen beginnt mit dem konstitutiven, in den meisten Pflanzengewebe aktiven, Polyubiquitinpromoter des Mais und endet mit dem Terminator des Nopalinsynthasegens (*nos*) aus dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens*. Mannose, ein mit der Glucose verwandter Zucker mit 6 C-Atomen, wird von Pflanzen aufgenommen und durch Hexokinase in Mannose-6-Phosphat überführt. Dieses ist zwar ungiftig, kann von Pflanzen aber nicht verwertet werden, weil ihnen die Phosphomannoseisomerase fehlt. Die Akkumulierung des Mannose-6-Phosphats in der Pflanzenzelle blockiert den zentralen Stoffwechselweg der Glykolyse und lässt die Zelle an Phosphat verarmen, was zu einer Wachstumshemmung führt. Mit *pmi* transformierte Pflanzen können Mannose-6-Phosphat verwerten und als Kohlenstoffquelle nutzen. *pmi* dient so als Selektionsmarker während des Transformationsprozesses und der darauf folgenden Regeneration kompletter transgener Pflanzen.

Im Genom von Event-3272-Mais findet man mit PCR- und DNA-Gelblotanalysen eine einzige 6100 bp lange Kopie der *input*-DNA, welche mit der T-DNA des Transformationsvektors bis auf geringfügige Deletionen an den Enden des Inserts identisch ist. Weitere Plasmidsequenzen sind nicht nachweisbar. Die Modifikation ist genetisch stabil und vererbt sich wie ein einzelner dominanter Erbfaktor nach den Mendelschen Regeln. Die neue Amylase kann aus Maiskörnern mit einem bei hoher Temperatur durchgeführten Extraktionsprozeß gereinigt und dann biochemisch charakterisiert werden. Die Aminosäuresequenz entspricht bis auf die angefügte Signalsequenz der DNA-Sequenz des synthetischen *amy797E*. Die enzymatischen Eigenschaften von AMY797E gleichen denen kommerzieller bakterieller Amylasen. Das Enzym wird nur im Korn gebildet, wo es in einer Konzentration von 1044 - 1264 µg Frischgewicht zu finden ist. In Blättern und im Pollen ist es nicht nachweisbar.

Die Phosphomannoseisomerase der neuen Maissorte besteht aus 391 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von ca. 45 kDa. Die Aminosäuresequenz ist bis auf die zusätzliche Signalsequenz (16 AS) identisch mit derjenigen der α -Amylase von *E. coli*. Da die Expression von einem konstitutiven Promoter gesteuert wird, findet man es nicht nur im Korn, sondern auch in anderen Pflanzengeweben. Die gebildeten Enzymmengen sind relativ gering (0,4 - 8 µg Frischgewicht).

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Anbauversuche im Feld, die in den Jahren 2003 und 2004 an mehreren Standorten im US-amerikanischen Maisgürtel durchgeführt wurden, und die anschließenden Bonitätsprüfungen ergaben abgesehen von der Gegenwart der beiden neuen Proteinen keine Unterschiede zu konventionellen Maiskultivaren. Auch in der biochemischen Zusammensetzung und der Futterqualität unterscheidet sich die Sorte nicht von anderen Maislinien. Da die thermostabile α -Amylase im Korn in relativ hohen Konzentrationen (800 - 1600 µg/g Feuchtwicht) gebildet wird, genügt bereits eine Beimischung von Event-3272-Mais zu konventionellem Mais, um die Stärkehydrolyse ohne Zugabe mikrobieller thermostabiler α -Amylasen zur Maische bei Temperaturen um 90 °C durchführen zu können.

3.3.1.7 LY038

Maisproteine haben nur einen geringen Lysingehalt, zu wenig, um die Eiweißversorgung mit Mais und Maisprodukten gefütterter Haustiere sicherzustellen. Gering ist auch der Gehalt an freiem Lysin in den Geweben der Maispflanze und im Korn. Die Entwicklung von Nahrungspflanzen mit ausreichendem Gehalt an ernährungsphysiologisch vollwertigen Proteinen gehört zu den hochrangigen Zielen der modernen Pflanzenzüchtung. Höhere Pflanzen synthetisieren Lysin aus der Aminosäure Asparaginsäure. Der Syntheseweg ist relativ kompliziert und umfasst 9 enzymatische Syntheseschritte. Im ersten Schritt entsteht aus Aspartat L-4-Aspartylphosphat, im zweiten L-Aspartat-4-Semialdehyd, im dritten Dihydrodipicolinsäure. Schritt 3 wird durch Dihydrodipicolinatsynthase katalysiert. Das pflanzliche Enzym wird durch Lysin, das Endprodukt des Lysinbiosynthesewegs, gehemmt. So entsteht eine negative Rückkopplungsschleife, welche die Lysinkonzentration in der Zelle unabhängig vom Lysinverbrauch konstant hält. Diese Form der Selbstregulation des Stoffwechsels nennt man Endprodukthemmung. Sie ist ein allgemeiner, weit verbreiteter Mechanismus der Stoffwechselregulation. *Corynebacterium glutamicum* besitzt eine Dihydrodipicolinatsynthase, welche durch Lysin nicht abgeregelt wird und ihre Aktivität auch in Gegenwart hoher Lysinkonzentrationen behält. Durch Expression dieses Enzyms im transgenen Mais kann die Endprodukthemmung des Lysinbiosynthesewegs aufgehoben werden. Die Lysinkonzentration in der Zelle erreicht dann weit höhere Werte als im konventionellen Mais, wodurch der Lysinmangel der Maisfuttermittel ausgeglichen werden kann. Nach diesem Prinzip ist der nachfolgend charakterisierte LY038-Mais entwickelt worden.

Zulassung

LY038 von Monsanto ist ein erstes Beispiel einer Generation von Biotechmaissorten mit einem neuen beim konventionellen Mais nicht vorhandenen Qualitätsmerkmal. LY038 ist zur Verwendung als Tierfutter gedacht, vorwiegend in der Geflügel- und Schweinezucht, um die übliche Supplementierung des Futters mit Lysinverbindungen entbehrlich zu machen. Zum Anbau zugelassen wurde die Sorte 2006 in den USA, 2007 auch in Japan.

Molekulargenetik

Das Genom von LY038 enthält das *cordapA*-Gen von *Corynebacterium glutamicum*, welches eine nicht durch Lysin hemmbare Dihydrodipicolinatsynthase kodiert. Der Promoter ist ein modifizierter Globulinpromoter des

Maisgenoms. Die Globuline bilden eine Fraktion der Speicherproteine des Maiskorns. Da der Promoter gewebespezifisch ist, werden sie nur im Korn gebildet. Die Verwendung dieses Promoters stellt sicher, dass *cordapA* nur im Samengewebe abgelesen werden kann und der Lysinstoffwechsel in allen anderen Pflanzenteilen unbeeinflusst bleibt. Der Promoter wurde durch Einbau eines Introns für die Expression im Mais optimiert. Das Intron stammt aus einem Actingen des Reisgenoms. Actin ist ein dem gleichnamigen Protein des Wirbeltiermuskels ähnliches funktionsnotwendiges Protein der Pflanzenzelle. Auch dieser Mais wurde wie die Mehrzahl der heute angebauten transgenen Linien durch biolistische Transformation von Pflanzenzellen hergestellt.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die Einführung *cordapA* ins Maisgenom produziert ein Maiskorn mit höherem Lysingehalt und höherem Ernährungswert. Beim konventionellen Mais liegt der gesamte Lysingehalt zwischen 2500 und 2800 ppm, wovon der größte Teil in Proteinen gebunden ist. Der Gehalt an freiem Lysin beträgt etwa 100 ppm. Demgegenüber haben LY038-Körner einen Gehalt von 1000 - 2500 ppm an freiem Lysin und einen Gesamtlysingehalt von 3500 - 5300 ppm. Abgesehen vom höheren Gehalt an freiem Lysin und seinen Abbauprodukten zeigen LY038-Pflanzen weder fassbare Veränderungen des Phänotyps noch Abweichungen in der biochemischen Zusammensetzung der Körner. Jedenfalls zeigten quantitative Analysen von ca. 85 verschiedenen Metaboliten - 75 aus dem Korn und 10 aus der Pflanze - keinerlei Abweichungen von den Werten konventioneller Linien.

3.3.1.8 MON87460

Zulassung

MON87460 ist ein monotransgener Hybridmais mit signifikant verbesserter Trockentoleranz, der durch Kreuzung einer trocken tolerantanten transgenen Maislinie (CspB-Zm event 1) mit konventionellen Sorten erhalten wurde. MON87460 bildet ein aus *Bacillus subtilis* stammendes Kälteschockprotein (CspB). Die Sorte wurde in Kolumbien (2008), Kanada ((2010) und den USA (2011) zugelassen. Seit 2013 wird das Saatgut vom Hersteller unter dem Namen DroughtGard™ vertrieben und in den besonders trocken gefährdeten Regionen des nordamerikanischen Maisgürtels im Produktionsmaßstab eingesetzt ([DiLeo, 2012](#)).

Molekulargenetik

Kälteschockproteine (cold shock proteins, CSPs) sind RNA-Chaperone. Letztere bilden eine Klasse ubiquitärer, bei allen Organismen und selbst bei Viren gefundener Proteine, welche in der Lage sind, missgefaltete RNA-Moleküle, wie sie unter suboptimalen physikochemischen Bedingungen wie Kälte oder Hitze leicht entstehen können, zu entwirren und so die biologische Funktion der RNA zu erhalten. Colibakterien stellen das Wachstum bei Kältebehandlung ein, was von einem starken Rückgang der Proteinsynthese begleitet ist. Während des Kälteschocks akkumuliert sich ein kleiner Satz von Proteinen, der Kälteschockproteine, die bis 10% der neu synthetisierten Proteine kältegeschockter Zellen ausmachen können. CspA von *E. coli* besitzt eine aus 65 - 70 Aminosäuren aufgebaute Molekülregion, die Kälteschockdomäne, welche auch in CSPs anderer Pro- und Eukaryonten gefunden wird. Die Kälteschockdomäne vermag Doppelstrang-RNA (dsRNA) zu binden und in Einzelstrang-RNA (ssRNA) umzuwandeln. Nach einem neueren Modell sollen CSPs zusammen mit Helikasen, Doppelstränge entwindenden Enzymen, zusammenarbeiten, um missgefaltete mRNA zu retten und die korrekte Initiierung der Proteinsynthese an den Ribosomen zu ermöglichen.

Verschiedene an Pflanzen gemachte Beobachtungen stützen die Hypothese, dass pflanzliche CSPs ebenso wie die der Bakterien eine RNA-Chaperonaktivität besitzen und die abiotische Stresstoleranz verbessern können. So kennt man ein RNA bindendes Protein von *Arabidopsis*, welches die Anpassung an Salz- und Kältestress erleichtert. Wenn zwei bakterielle CSPs, die RNA-Chaperone CspA von *E. coli* und CspB von *Bacillus subtilis* in transgenem Mais, Reis und *Arabidopsis* konstitutiv exprimiert werden, verbessert sich die Kälte-, Hitze- und Trockentoleranz der Pflanzen. Dagegen verhalten sich Transgeniker, die ein mutiertes CspA exprimieren, welches keine RNA-Chaperonaktivität mehr besitzt wie nicht transgene Kontrollen. Demnach ist die Chaperonaktivität der CSPs essentiell für die Stresstoleranz. Die Wirksamkeit bakterieller CSPs in Pflanzen und die Tatsache, dass Mono- und Dikotylen gleich reagieren sprechen dafür, dass die Stressanpassung einem universellen während der Evolution konservierten Mechanismus folgt ([Castiglioni u. a., 2008](#)).

Das Genom von MON87460 trägt eine einzelne Kopie der von seinem transgenen Elter (CspB-Zm event 1) übernommenen Expressionskassette, welche das *cspB*-Gen enthält. Die Kassette besteht aus folgenden

hintereinander liegenden Funktionselementen: 1. Dem Promoter, der Leitsequenz und dem ersten Intron des Reis-Actingens (*ract1*); Dieser Promoter bewirkt die konstitutive Expression von *cspB*. 2. Der kodierenden Sequenz des Kälteschock-RNA-Chaperons CspB von *Bacillus subtilis*. 3. Der Terminatorsequenz des Transkripts 7 von *Agrobacterium tumefaciens*; 4. Einer *loxP*-Sequenz des Bakteriophagen P1 für die Cre/*lox*-Rekombination. 5. dem CaMV35S-Promoter. Er bewirkt die konstitutive Expression des nachfolgenden *nptII*-Gens aus dem Tn5-Transposon von *E. coli*. 6. dem Transkriptionsterminator des Transkripts 7 von *Agrobacterium tumefaciens*. 7. Einer zweiten *loxP*-Sequenz. Die beiden *loxP*-Sequenzen ermöglichen die Aktivierung der Cre/*lox*-Rekombination, wodurch der Kanamycinselektionsmarker, der nach der Transformation nicht mehr gebraucht wird, aus dem Genom sexueller Nachkommen von MON87460 oder CspB-Zm-1 entfernt werden kann.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die neuen Linien und aus ihnen hervorgegangene Hybriden sind in jahrelangen Feldversuchen einem breiten Spektrum experimentell erzeugter oder natürlicher Trockenbedingungen ausgesetzt worden, wie sie in den westlichen Trockengebieten des US-amerikanischen Maisgürtels vorkommen. Der gesamte Testprozess dauerte rund 12 Jahre. Unter Trockenstress liefert CspA- und CspB-Mais einen Mehrertrag von 4 - 30%. (Abb. 47). Die Pflanzen wachsen besser; die Blätter haben einen höheren Chlorophyllgehalt und zeigen eine höhere

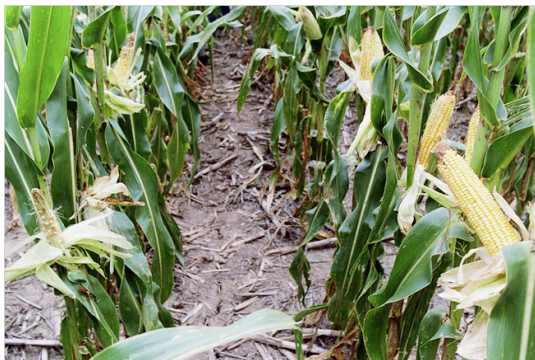


Abb. 47. Gewöhnlicher Mais (links) und transgener CspB-Mais (rechts) unter Trockenstress auf einem Versuchsfeld in Nebraska 2007. Die Kolben der nicht transgenen Sorte sind kleiner und haben viel weniger Körner ([New York Times](#))

Photosyntheserate. Unter Normalbedingungen, d. h. bei guter Wasserversorgung, liefern sie denselben Ertrag wie nicht transgene Kontrollen. Andernfalls wäre das Trockentoleranzmerkmal wirtschaftlich wertlos, da Trockenperioden oft unregelmäßig auftreten und kaum vorhersagbar sind. Insgesamt hat sich der relative Mehrertrag als stabil und weitgehend unabhängig vom genetischen Hintergrund, der Schwere der Trockenheit und den sonstigen Umweltbedingungen erwiesen (Abb. 48). Die Ertragsverbesserung resultiert überwiegend aus der höheren Körnerzahl der Kolben, nicht aus höherem Korngewicht. Dies ist zu erwarten, wenn Wassermangel während des Blühens auftritt und Blütenentwicklung und Fruchtausatz dadurch beeinträchtigt werden. Trockentoleranter Biotechmais bildet keine toxischen oder den Ernährungswert mindernden (antinutritiven) Substanzen und unterscheidet sich in allen übrigen Leistungsmerkmalen nicht von konventionellem Mais. Die beiden Chaperone haben nur 61% Sequenzhomologie und können doch beide die Stresstoleranz verbessern. Da man viele RNA-Chaperone aus Bakterien und Höheren Organismen kennt und sich Expressionscharakteristik und kodierende Sequenzen von Transgenen in weiten Grenzen

variieren lassen, kann es durchaus sein, dass die Trockentoleranz durch geeignetere Chaperone noch verbessert werden kann ([Castiglioni u. a., 2008](#); [DiLeo, 2012](#)).

3.3.2 Oligotransgene Sorten (Stapelsorten)

3.3.2.1 LY038 x MON810

Stapelsorten exprimieren mehr als ein Funktionsgen. Wenn sie, was meist der Fall ist, durch konventionelle Kreuzung und Selektion aus bereits zugelassenen transgenen Vorläufern gezüchtet werden, unterliegen sie nicht nochmals den für neue transgene Biotechsorten geltenden Zulassungsprüfungen. Manche Länder, darunter Kanada und Japan, verlangen auch für solche Sorten bestimmte Sicherheitsnachweise. Stets muss vor dem Anbau geprüft werden, ob durch die Kombination verschiedener Transgene in derselben Pflanze nachteilige, in keiner der Elternpflanzen beobachtete Eigenschaften entstehen. Kreuzt man LY038 mit MON810, so erhält man die Stapelsorte LY038 x MON810. Sie vereint beide Merkmale der Elternlinien, hohen Gehalt an freiem Lysin und Resistenz gegenüber dem Maiszünsler und verwandten Schmetterlingen. Maisfutter, welches aus dieser Sorte hergestellt wird, hat denselben Ernährungswert wie aus konventionellem Mais hergestelltes Futter, das mit freiem Lysin angereichert wurde. Mit Hühnern über 21 Tage durchgeführte Fütterungsstudien ergeben, dass die mit den lysinreicheren Futtersorten gefütterten Tiere am Ende der Versuchsperiode ein um 22 - 25% höheres Körpergewicht besitzen als die mit gewöhnlichem Maisfutter gefütterten Kontrollgruppen. Die Hybridsorte zeigt

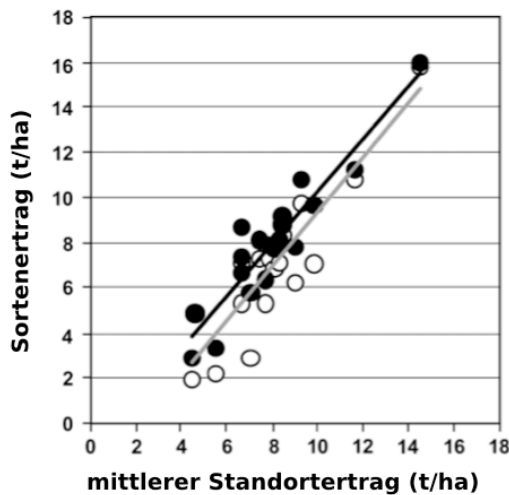


Abb. 48. Mehrertrag von CspB-Hybridmais bei Trockenheit. Abszisse: mittlerer Jahresertrag von Hybridmais an Standorten mit abnehmender Trockenheit. Ordinate: mittlerer Jahresertrag einer CspB-Hybride (schwarz) und ihrer konventionellen Kontrolle (grau); nachbearbeitet ([Castiglioni u. a., 2008](#). Plant Physiology 147:446-455).

keine unerwarteten oder negativen Interaktionen zwischen den beiden Transgenen, und die damit gefütterten Vögel lassen keine Beeinträchtigung ihres Gesundheitszustands oder ihres Wohlbefindens erkennen ([Lucas u. a., 2007](#)).

3.3.2.2 MON863 x MON810 x NK603

Diese Sorte ist eine durch Kreuzung der insektenresistenten Inzuchtlinie MON863 x MON810 mit der glyphosattoleranten Linie NK603 entstandene F₁-Hybride. Sie ist glyphosattolerant und resistent gegenüber dem Maiswurzelbohrer, dem Maiszünsler und mit diesem verwandte Schmetterlinge. Die Pflanzen bilden alle Transproteine ihrer Ahnen: Cry1Ab von MON810, Cry3Bb1 von MON863 und die EPSP-Synthase von Nk603. Beim Vergleich des Metabolismus der neuen Sorte mit dem der Eltern sind keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden worden. Die kombinierten Resistenzeigenschaften sind wechselwirkungsfrei und entstehen durch einfache additive Überlagerung der Einzelmerkmale. Das Resistenzniveau jedes einzelnen Merkmals entspricht demjenigen der entsprechenden Elternlinie. Diesen gegenüber unempfindliche Insekten zeigen auch gegenüber der Stapelsorte keine gesteigerte Empfindlichkeit. Die Glyphosattoleranz der neuen Sorte entspricht derjenigen der Elternlinie Nk603.

Es sind Feldversuche in der Absicht durchgeführt worden, die Schmetterlings- und Käferresistenz der neuen Sorte mit den Insektenresistenzen von MON810 und MON863 zu vergleichen, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede im Resistenzniveau gefunden werden konnten. Der Expressionspegel der beiden von MON810 und MON863 gebildeten Bt-Toxine wird durch die Hybridisierung nicht verändert, und die kombinierte Expression beider Toxine in der neuen Sorte schädigt gegenüber den Elternpflanzen unempfindliche Nichtzielinsekten nicht. Die Glyphosattoleranz der Stapelhybride ist identisch mit derjenigen der Elternsorte Nk603. Sie liefert einen höheren Ertrag als die Elternpflanzen und zeigt damit den bei der Kreuzung reinerbiger Linien gewöhnlich auftretenden Heterosiseffekt. Er ist nicht auf die Kombination der Transgene zurückzuführen, da diese nicht interagieren und den Ertrag nicht beeinflussen.

3.3.3 Weitere Beispiele

Neben den genannten oligotransgenen Sorten gibt es noch zahlreiche weitere. Die Tabelle 13 zeigt eine Auswahl.

Sorte	Jahr	Hersteller	Verfahren	Herbizidresistenz gegen		Insektenresistenz gegen	
				Phosphinothricin	Glyphosat	Maiszünsler	Maiswurzelbohrer
ACS-ZM003-2 x MON-00810-6	1995	Bayer	Kreuzung	<i>pat</i>		<i>cry1Ab</i>	
CBH351	1998	Aventis	Biolistik	<i>bar</i>		<i>cry9C</i>	
DAS-06275-8	2004	Dow	Agrolistik	<i>bar</i>		<i>cry1F</i>	
DAS-01507 x MON-00603-6	2000	Dow	Kreuzung	<i>pat</i>	EPSPS	<i>cry1Fa2</i>	
DKB-89614-9	1997	Dekalb	Biolistik	<i>bar</i>		<i>cry1Ac</i>	
MON-00603-6 x MON-00810-6	1995	Monsanto	Kreuzung		EPSPS	<i>cry1Ab</i>	
MON-00863-5 x MON-00603-6	2000	Monsanto	Kreuzung		EPSPS		<i>cry3Bb1</i>
MON-00863-5 x MON-00810-6 x MON-00603-6	1995	Monsanto	Kreuzung		EPSPS	<i>cry1Ab</i>	<i>cry3Bb1</i>
MON-88017-3	2005	Monsanto	Agrolistik		EPSPS		<i>cry3Bb1</i>
DAS-01507-1	2001	Mycogen	Biolistik	<i>pat</i>		<i>cry1Fa2</i>	

Tab 13. Biotechmaislinien mit mehr als einem Resistenzmerkmal.

Die Gene in den Spalten 5-8 kodieren folgende Proteine:

pat: Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (*Streptomyces viridochromogenes*)

bar: Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (*Streptomyces hygroscopicus*)

EPSPS: 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (*Agrobacterium tumefaciens*)

cry1Ab, *cry1Ac*, *cry9C*, *cry1Fa2*, *cry1F*: Delta-Endotoxine von *Bacillus thuringiensis*, giftig nur für Schmetterlinge

cry3Bb1: Delta-Endotoxin von *Bacillus thuringiensis*, giftig nur für Käfer (Chrysomeliden)

Die Jahreszahlen in der zweiten Spalte beziehen sich auf das Jahr der erstmaligen Zulassung, bei Hybriden auf das Zulassungsjahr des zuerst zugelassenen Kreuzungspartners ([CERA, 2015](#)).

3.4 Prototypen

3.4.1 Verbesserung der Anbauqualität

3.4.1.1 Schädlingsresistenzen

Die ideale schädlingsresistente Maispflanze gibt es bisher nicht. Sie besäße vollkommene Resistenz gegenüber allen tierischen Maisschädlingen. Um diesem Ziel näher zu kommen, versucht man, mehrere aus verschiedenen *Bacillus-thuringiensis*-Stämmen stammende Endotoxine so zu kombinieren, dass ein möglichst breites Wirkungsspektrum bei gleichzeitiger Unschädlichkeit für die harmlose Insektenfauna entsteht. So gibt es bereits Maispflanzen, die 3-5 verschiedene Bt-Toxingene exprimieren und dadurch ausreichende Resistenz gegen die drei wichtigen in den Tropen vorkommenden Zünsler *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* und *D. grandiosella* besitzen (Rang u. a., 2004). Wesentlich weiter geht eine Strategie von Mehlo u. a. (2005). Diese Arbeitsgruppe hat Fusionsgene hergestellt, welche aus einem Bt-Toxingen bestehen, z. B. dem δ -Endotoxingen *cry1Ac*, und einem Teil, welcher die B-Kette des Ricins kodiert. Ricin ist ein auch für den Menschen äußerst giftiges Protein aus den Samen der Ricinuspflanze (*Ricinus communis*). Das Ricinmolekül besteht aus einer giftigen A- und einer nicht giftigen B-Kette. Die B-Kette ermöglicht dem Molekül die Bindung an die Zelloberfläche und unterstützt dadurch das Eindringen der A-Kette in das Zellplasma, wo diese die Proteinsynthese blockiert. Obwohl die B-Kette des Ricins für sich genommen nicht giftig ist, sind transgene Maispflanzen, die das Fusionsgen exprimieren, nicht nur wesentlich toxischer für die Zielinsekten als gewöhnlicher Bt-Mais, sondern auch resistent gegen weitere Schadinsekten, die von dem Cry1Ac-Toxin nicht angegriffen werden (Rang u. a., 2004).

3.4.1.2 Herbizidresistenzen

Seit der Einführung des Biotechpflanzenanbaus um 1995 sind die Anbauflächen weltweit Jahr um Jahr gewachsen und lagen 2013 bei 175 Mha. Über 90% der Biotechpflanzenfelder sind glyphosatresistent. Die Glyphosatresistenz ist damit das verbreitetste Merkmal der biotechnischen Pflanzenproduktion. Die mit der transgenen Glyphosatresistenz verbundene Vereinfachung und Verbilligung der Unkrautbekämpfung und andere Vorteile haben vielfach dazu geführt, dass traditionelle bewährte Verfahren der Unkrautbekämpfung wie die gleichzeitige oder turnusmäßige Verwendung von Herbiziden mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus, die Rotationspflanzung oder die Kombination chemischer und mechanischer Methoden der Unkrautbekämpfung vernachlässigt wurden. Ein Unkrautrisiko ist auch der pfluglose Ackerbau (Trewavas, 2004), der in den USA stark ausgedehnt wurde, weil er gegenüber der konventionellen Feldwirtschaft und auch dem Biolandbau erhebliche ökologische und wirtschaftliche Vorteile bietet. Er ist erst durch die Kombination moderner Totalherbizide mit gentechnischen Herbizidresistenzen möglich geworden. Der nachhaltige Glyphosateinsatz auf immer größeren Anbauflächen erzeugte einen wachsenden Selektionsdruck zugunsten glyphosatresistenter Unkräuter. 2009 kannte man insgesamt 19 glyphosatolerante ein- und zweikeimblättrige Unkräuter. Die größte Gefahr geht gegenwärtig von mehreren zweikeimblättrigen Unkräutern der Gattung *Ambrosia* (Traubenkraut, engl. ragweed) und *Conyza canadensis* (Kanadisches Berufkraut) aus. Die meisten glyphosatresistenten Unkräuter fand man in den vorausgegangenen 8 Jahren, was mit der Ausdehnung des Biotechpflanzenanbaus korreliert. Bei Fortsetzung dieses Trends müssen die Vorteile der Glyphosatanwendung nach und nach verlorengehen. Wenn sie den Landwirten erhalten bleiben sollen, braucht man zusätzliche Unkrautbekämpfungsmethoden, welche Glyphosat ergänzen können.

2,4-D und Aryloxyphenoxypropionate

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) ist ein seit Jahrzehnten bekanntes billiges und wirksames Breitbandherbizid, welches gegen viele glyphosatresistente Unkräuter wirkt. Strukturell ist es eng mit dem natürlichen Pflanzenwachstumshormon Auxin verwandt und wird an die Auxinrezeptoren pflanzlicher Zellen gebunden. 2,4-D wirkt wie natürliches Auxin. In den Mengen, die beim Herbizideinsatz angewandt werden führt es zu unorganisiertem Pflanzenwachstum und zum Tod der Pflanze. Gräser sind relativ unempfindlich gegen 2,4-D, jedoch bewirkt es beim Mais im späten Keimlingsstadium abnorme morphologische Veränderungen und ist im konventionellen Maisanbau deshalb nur sehr begrenzt verwendbar. 2,4-D wird im Boden relativ schnell abgebaut und ist nur wenig toxisch für Tiere und den Menschen. Natürliche 2,4-D-Resistenzen wurden bisher kaum gefunden, obwohl es eines der am häufigsten eingesetzten Herbizide ist. Gentechnische 2,4-D-Resistenzen könnten deshalb eine wertvolle Ergänzung der Glyphosatresistenz bilden.

Man kennt bakterielle Aryloxyalkanoat-Dioxygenasen (AADs), welche 2,4-D abbauen können. Diese Enzyme spalten 2,4-D in nicht herbizidwirksames Dichlorphenol und Glyoxylat. Manche von ihnen können noch andere verbreitet eingesetzte Breitbandherbizide umsetzen. AAD-1 z. B. spaltet nicht nur 2,4-D, sondern auch potente grasselektive Aryloxyphenoxypionat-Herbizide wie Quizalafop und Haloxyfop. Diese Verbindungen hemmen die Acetylcoenzym-A-Carboxylase (ACC) der Gräser, was den ersten Schritt der Lipidsynthese blockiert und zum Tod der Pflanze führt. AAD-12 inaktiviert nicht nur 2,4-D sondern auch die synthetischen Auxine Fluroxypyr und Dichlopyr. Transgener Mais, welcher ein AAD-1-Gen unter Kontrolle des konstitutiven Maisubiquitinpromoters in allen Pflanzenteilen exprimiert, ist gegen den ACC-Hemmer Haloxyfop und andere grasselektive Herbizide aus der Reihe der Aryloxyphenoxypionate resistent (Abb. 49). Die Resistenz vererbt sich nach den Mendelschen Regeln und ist über mehrere Generationen stabil. Die Pflanzen vertragen auch 2,4-D und zeigen nicht die bei 2,4-D-Anwendung an konventionellen Maiskeimlingen verursachten morphologischen Schädigungen. Die Pflanzen haben sich in Feldversuchen in den USA bewährt. Auch transgene Sojabohnen, die



Abb. 49. Wirkung von Quizalafop auf AAD1-exprimierende (links) und gewöhnliche (rechts) Maispflanzen ([Wright u. a., 2010](#). PNAS 107: 20240-20245).

AAD-12 exprimieren sind resistent gegen 2,4-D. Damit ist gezeigt, dass die Expression eines einzigen Transgens ausgeprägte Resistenz gegen zwei Herbizide bewirken kann, deren Wirkungsmechanismen sowohl voneinander als auch dem des Glyphosats völlig verschieden sind. Diese Transgene eignen sich deshalb vermutlich gut, um die Glyphosatresistenz zu ergänzen und die Produktivität und Umweltfreundlichkeit herbizidresistenter Ackerpflanzen zu bewahren ([Wright u. a., 2010](#)).

Dicamba

Dicamba (3,6-Dichlor-2-Metoxibenzoessäure) gehört wie 2,4-D zur Gruppe der Auxinherbizide und wird ebenso wie dieses seit langem zur Bekämpfung zweikeimblättriger Unkräuter im Mais- und Getreidebau eingesetzt. Die Verbindung ist relativ ungiftig und wird gut im Boden abgebaut. In dem Bodenbakterium *Pseudomonas maltophilia* beginnt die Dicambaentgiftung mit der Umwandlung in 3,6-Dichlorsalicylsäure durch Dicbamomonoxygenase (DMO). Das Enzym ist zusammen mit zwei weiteren Proteinen, einer Reduktase und einem

Ferredoxinmolekül Teil eines größeren Enzymkomplexes. Er bildet eine kurze Elektronentransportkette, in welcher Elektronen durch die Reduktase von einem Elektronenspende (NADH) auf Ferredoxin und von diesem auf die Oxygenase übertragen werden. Dort dienen sie der Aktivierung eines Sauerstoffmoleküls, welches dann die O-Methylgruppe des Dicambamoleküls oxidiert und abspaltet. Wenn das bakterielle DMO-Gen mit einer Chloroplastentransitsequenz verknüpft und in transgenen Modellpflanzen wie *Arabidopsis*, Tabak und Tomate exprimiert wird, sind für die Reaktion nicht alle drei Enzyme erforderlich, da DMO das mit dem bakteriellen Ferredoxin strukturverwandte Ferredoxin der Chloroplasten als Elektronenspende nutzen kann. Mais verträgt Dicamba ziemlich gut, und klare Symptome einer Schädigung sieht man erst bei hohen Dosen. Das mit dem Wachstumshormon Auxin strukturverwandte Dicamba hat dann typische Auxinwirkungen. Die Maisstengel wachsen nicht mehr aufrecht, sondern schräg oder niederliegend und das Wurzelwerk verkümmert. Transgene DMO-exprimierende Maispflanzen zeigen diese Symptome auch bei der sehr hohen Dosis von 27 kg/ha nicht. Dicambaschäden sind bei diesen Pflanzen nicht zu befürchten, auch dann nicht, wenn das Herbizid zu hoch dosiert wird oder in Wachstumsphasen oder bei Wetterbedingungen verwendet wird, die eine Schädigung begünstigen. Der Anbau dicambatoleranter Maissorten ist deshalb für den Maisbauer attraktiv, vor allem in Gegenden, wo glyphosatresistente Unkräuter existieren. Dicambatolerante Elitemaissorten stehen in den USA kurz vor der Markteinführung. In naher Zukunft werden auch dicambatolerante Soja- und Baumwollsorten erhältlich sein.

Die Einführung neuer Resistenzmerkmale in den Biotechpflanzenanbau wird die Unkrautbekämpfung verbessern und flexibler machen. Bisher hat die biologische Evolution herbizidresistenter Unkräuter mit den Fortschritten der Agrotechnik nicht Schritt halten können. Solange dies zutrifft, ist es unwahrscheinlich, dass die Vorteile des Anbaus herbizidtoleranter Biotechpflanzen infolge der Resistenz evolution verlorengehen.

3.4.1.3 Krankheitsresistenz

Brandpilze (Familie *Ustilaginaceae*) sind landwirtschaftlich wichtige Pathogene, die signifikante Ernteverluste verursachen können. *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands (Maisbrand) und kommt in allen Maisanbauländern vor. Der Pilz infiziert ausschließlich teilungsfähiges Gewebe und kann sich insbesondere in gestressten Pflanzen ausbreiten. Er erzeugt tumorartige Wucherungen an den Stengeln und besonders am Kolbenansatz. Erkrankter Mais kann siliert und verfüttert werden und ist in manchen Ländern auch zum menschlichen Verzehr zugelassen. Mit zunehmendem Befall sinkt jedoch der Nährwert der Silage und die Gefahr von Schimmelpilzbildung steigt. Damit steigt auch das Risiko der Belastung mit gesundheitsgefährdenden *Fusarium*-Toxinen.

Wirtschaftliche Bedeutung erlangt *Ustilago maydis* in Deutschland nur in Einzeljahren. In den USA, dem größten Maisproduzenten, bleiben die Ernteverluste beim Hartmais gewöhnlich unter 2%. Beim wesentlich empfindlicheren Süßmais können sie bis 20% betragen. 2009 wurde in den USA auf 25 Mha Mais angebaut, und der Wert der Ernte belief sich auf 48,7 Mrd. USD. Der durch den Pilz verursachte Verlust von 2% liegt demnach immerhin bei annähernd 1 Mrd. USD. Er ist seitdem größer geworden, weil der Maisanbau im Interesse der Bioethanolproduktion weiter ausgedehnt wurde. Auch in Deutschland hat die Ausdehnung der Maisanbauflächen („Vermassung“ der Landschaft), Folge der Energiepolitik, Fortschritte gemacht. 2010 betrug der Flächenzuwachs 8,7%, 2011 6,8% gegenüber dem Vorjahr ([Maiskomitee, 2011](#)). Mit der Ausweitung des Anbaus wird auch die Bekämpfung wirtschaftlich bedeutsamer Maiskrankheiten immer wichtiger.

Eine direkte Bekämpfung des Pilzes ist bislang nicht möglich; man kennt jedoch partiell pilzresistente Sorten. Nach neueren Studien ist die Resistenz ein polygenes Merkmal, bei dem multiple QTLs (quantitative trait loci) das Resistenzniveau bestimmen. Für die konventionelle Resistenzzüchtung ist dies eine denkbar ungünstige Ausgangslage. Ein gentechnischer Ansatz zur Züchtung pilzresistenter Maislinien nutzt den Umstand, dass es mehrere Stämme (Killerstämme) von *Ustilago maydis* gibt, die sich gegenseitig im Wachstum hemmen. Ursache dieser Konkurrenzhemmung ist die Sekretion fungizider Proteine (Killertoxine), die von den Killerstämmen gebildet und ins Medium abgegeben werden. Ähnliche Killertoxine wurden in mehreren Hefestämmen gefunden. Man schätzt, dass ca. 1% der in der Natur vorkommenden *Ustilago-maydis*-Brandpilze diese Toxine abgeben. Es sind bisher 3 Killerstämme von *Ustilago maydis* bekannt. Jeder Stamm ist resistent gegen sein eigenes Toxin, aber empfindlich gegen die Toxine der anderen. Maispflanzen, die eines der Killertoxine exprimieren, sollten deshalb resistent gegen alle *Ustilago-maydis*-Stämme sein bis auf den, von welchem das Killertoxin gebildet wird. KP4, das Killertoxin des P4-Stamms von *Ustilago maydis*, ist ein stark basisches Polypeptid von 105 Aminosäuren. Es hemmt Calciumkanäle in der Zellmembran der Pilzfäden, welche das Calcium zum Wachstum brauchen. *kp4* wurde für die Expression in Monokotylen sequenzoptimiert, mit einem pflanzlichen Sekretionssignal (Defensin) verknüpft und dann mit dem konstitutiven Ubiquitinpromoter (Ubi1) des Mais gekoppelt. Mit diesem Genkonstrukt transformierte Maispflanzen bilden KP4 in allen Pflanzenteilen, sezernieren das Toxin in den Zwischenzellraum (Apoplasten) und sind hochresistent gegen den Maisbeulenbrand. KP4 hat eine begrenzte fungizide Wirkung auf Schimmelpilze; daher könnte seine Expression im Mais auch zur Bekämpfung von *Fusarium*-Arten nützlich sein.

Sicherheit und Umweltverträglichkeit der *Ustilago*-Killertoxine sind nicht abschließend geklärt. KP4-transgener Weizen schädigt die Umwelt nach bisherigem Wissen nicht. Das Toxin scheint sehr wirkungsspezifisch zu sein. Anscheinend werden nur Brandpilze angegriffen. Menschliche, tierische und pflanzliche Zellkulturen werden nicht geschädigt. In künstlichen Verdauungsflüssigkeiten wird das Protein innerhalb von 60 s abgebaut. Es besitzt keine Sequenzähnlichkeit mit bekannten Allergenen, aber eine strukturelle Ähnlichkeit mit einem Skorpiengift, die für einen verwandten Wirkungsmechanismus spricht ([Allen u. a., 2011](#)).

3.4.1.4 Kältetoleranz

Neben Krankheiten, Unkräutern und Schädlingen, die man auch als biotische Stressfaktoren bezeichnet, gibt es abiotische Stressfaktoren, welche ebenfalls die Ernteerträge negativ beeinflussen. Die wichtigsten sind Kälte, Hitze, Trockenheit und Fehlen oder mangelnde Verfügbarkeit notwendiger Mineralsalze im Boden. Mais ist eine typische C₄-Pflanze, die bei warmen Temperaturen und hohem Lichtangebot mit hoher Effizienz Photosynthese treibt und CO₂ fixiert. Bei niedrigen Temperaturen werden Photosynthese und Wachstum drastisch reduziert. Eines der Schlüsselenzyme der für die C₄-Pflanzen typischen Form der CO₂-Fixierung, die Pyruvat-Orthophosphatdikinase (PPDK), verliert ihre Aktivität bereits bei Temperaturen unterhalb 12 °C. Man kann eine kälteunempfindlichere Form der PPDK in den Mais einführen, die aus dem Bakterium *Flaveria brownii* stammt.

Der Inaktivierungspunkt der Dikinase ist in diesen Pflanzen um ca. 3 °C nach unten verschoben. Allerdings ist noch unklar, ob dies bereits genügt, um eine Verbesserung der Photosyntheserate bei niedrigen Temperaturen zu bewirken ([Ohta u. a. 2004](#)).

3.4.1.5 Trockentoleranz

Die Trockentoleranz von DroughtGard™ (MON87460), dem ersten kommerziellen Biotechmais mit verbesserter Trockentoleranz, beruht auf der konstitutiven Expression eines bakteriellen Kälteschockproteins. Diese Proteine werden wie erwähnt unter abiotischen Stressbedingungen wie Hitze, Kälte oder Wassermangel vermehrt synthetisiert und können mithelfen, die biologisch aktive Konformation unter diesen Bedingungen instabiler RNA-Moleküle zu erhalten. Sie können so zentrale Zellfunktionen bis zu einem gewissen Grade vor den Stresswirkungen schützen. Die Empfindlichkeit einer Pflanze gegenüber Trockenheit hängt jedoch von vielen anatomischen und physiologischen Gegebenheiten ab, und so werden zahlreiche weitere Ansätze verfolgt, um die Trockentoleranz zu verbessern. Ein wesentlicher Faktor ist die Konzentration der in den Vakuolen der Pflanzenzellen gelösten Ionen, Zucker, Aminosäuren und anderer Metaboliten. Je höher die Konzentration dieser Osmoprotektoren ist, desto höher ist auch die osmotische Saugkraft der Zelle und damit ihre Fähigkeit, über die Wasserleitungsbahnen Wasser aus dem Boden aufzunehmen und so ihren Turgordruck auch bei niedrigem Wasserpotential der Bodenlösung aufrechtzuerhalten. Glycinbetain (N,N,N-Trimethylglycin) ist eine der am besten studierten osmoregulatorisch wirksamen Substanzen. Der Osmoschutzstoff kommt bei Pflanzen, Tieren und Bakterien vor. Gerste, Spinat und andere Pflanzen bilden vermehrt Glycinbetain als Antwort auf hohe Salzkonzentrationen im Boden und ebenso auf Trocken- oder Kältestress und sammeln den Osmoprotektor in den Vakuolen an. Glycinbetain wird aus Cholin gebildet. Im Spinat wird dieses durch ein Chloroplastenenzym, die Cholinmonooxygenase über Glycinbetainaldehyd als Zwischenprodukt zu Glycinbetain oxidiert. Bakterien wie *E. coli* besitzen eine membranständige von *betA* kodierte Cholindehydrogenase, die aus der Umgebung aufgenommenes Cholin zu Glycinbetain oxidiert.

Viele Osmoprotektoren werden aktiv, d. h. unter Energieverbrauch, von in der Vakuolenmembran verankerten molekularen Pumpen aus dem Zellplasma in die Vakuole gepumpt. Natrium- und Kaliumionen werden durch zwei Ionenpumpen im Austausch gegen Protonen in die Vakuole transportiert. Treibende Kraft dieses Gegentransports (Antiports) ist ein quer zur Membran orientierter Protonengradient. Er wird durch in der Vakuolenmembran sitzende Protonenpumpen, eine ATPase und eine Pyrophosphatase, aufrechterhalten, welche Protonen aus dem Cytoplasma in die Vakuole pumpen. Die ATPase bezieht ihre Energie aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat, die Pyrophosphatase aus derjenigen von Pyrophosphat. Diese Erkenntnisse haben zu der Vermutung geführt, dass die Trockentoleranz durch vermehrte Synthese von Osmoschutzstoffen und/oder verstärkten Transport dieser Metaboliten in die Vakuole der Pflanzenzelle verbessert werden kann. Wie die folgenden Beobachtungen zeigen, trifft dies zu.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Übertragung eines Gens, das die Glycinbetainbildung steigert, die Widerstandsfähigkeit gegen abiotischen Stress verbessern kann. Transgener Tabak mit *betA* von *E. coli* akkumuliert mehr Glycinbetain als der Wildtyp und widersteht Salz und Kälte besser. Die Übertragung des Gens in Mais oder Baumwolle verbessert die Trocken- und Kälteresistenz. So zeigen *betA* exprimierende Maispflanzen 21 Tage nach Beginn einer Trockenbehandlung im Gewächshausversuch um 8% mehr Gesamtbiomasse, um 56% höheres Kolbengewicht und um 14% höheren Wuchs als der Wildtyp. Wachstum und Entwicklung der Pflanzen sind insgesamt weniger beeinträchtigt als beim Wildtyp, und die *betA*-Pflanzen erholen sich nach Beendigung der Trockenbehandlung schneller ([Wei u. a., 2011](#)).

Die Überexpression einer ATPase (AVP1) der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) in transgener *Arabidopsis* verbessert die Trocken- und Salztoleranz der Pflanze. Der Effekt ist mit einer Erhöhung der Konzentration von Ionen und Metaboliten in der Vakuole korreliert. Auch transgene Tomaten und Baumwollpflanzen, welche die *Arabidopsis*-AVP1 exprimieren, sind trocken-toleranter als der Wildtyp. Dasselbe gilt für transgenen Tabak und transgene Baumwolle, die eine Pyrophosphatase (TsVP) aus der Vakuolenmembran der Salzkresse *Thellungiella halophila*, einer nahen Verwandten der Ackerschmalwand, exprimieren ([Lv u. a., 2009](#)). Beim Mais verbessert die heterologe Expression des TsVP-Gens die Trockentoleranz in ähnlicher Weise wie die Expression von *betA*. Unter den oben genannten experimentellen Bedingungen zeigen die Transgeniker 15% mehr Biomasse, 64% höheres Kolbengewicht und um 21% höheren Wuchs ([Li u. a., 2008](#)).

Kreuzt man transgene *betA*- und *tTsVP*-Maispflanzen, so exprimieren die Bastarde beide Gene. Nach Trockenstresseinwirkung haben die Stapelhybriden unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen 19%

mehr Biomasse, nahezu doppeltes Kolbengewicht und 24% höheren Wuchs als der Wildtyp. Offenbar addieren sich die Genwirkungen, was durch den Vergleich zahlreicher weiterer agronomischer Parameter bestätigt wird. Man gelangt so zu der Vermutung, dass die Trockentoleranz beim Mais und auch bei anderen Ackerpflanzen signifikant verbessert werden kann, wenn mehrere Transgene gestapelt werden, deren Funktionen bei der Stressbewältigung zusammenwirken ([Wei u. a., 2011](#)).

Neben der Akkumulierung von Osmoseschutzstoffen in der Vakuole besitzen Pflanzen noch weitere Mechanismen, die vor abiotischen Stressfaktoren schützen können. Beim Tabak kennt man eine Proteinkinase (NPK1), deren Expression gleichermaßen die Toleranz gegenüber Hitze, Kälte und hohen Salzkonzentrationen, wie sie im Gefolge von Trockenheit im Boden auftreten können, fördert. Wird dieses Enzym konstitutiv im Mais exprimiert, so wird die Trockentoleranz verbessert. Unter Trockenheitsbedingungen zeigen transgene Maispflanzen deutlich höhere Photosyntheseraten als die nicht transgenen Kontrollen, was vermuten lässt, dass NPK1 einen Mechanismus auslöst, der den Photosyntheseapparat vor Trockenschäden schützt. Die Kornmasse der transgenen Pflanzen entspricht unter Trockenstress etwa derjenigen bei guter Wasserversorgung. Bei den nicht transgenen Kontrollpflanzen ist sie deutlich reduziert ([Shou u. a., 2004](#)).

3.4.1.6 Salztoleranz

Rund 20% der weltweit genutzten Ackerflächen und 50% der bewässerten Flächen sind versalzten Böden. Die Bodenversalzung hat teilweise natürliche Ursachen, wird aber durch nicht optimale Bewässerungsverfahren wesentlich beschleunigt. Da die Weltagrarfläche in den letzten 10 Jahren kaum gewachsen ist und inzwischen an ihre natürlichen Grenzen stößt, bildet die Bodenversalzung nach Trockenheit und Dürre das größte Hindernis bei der dringend notwendigen Steigerung der globalen Nahrungsmittelproduktion. Pflanzen, die auf versalzten Böden wachsen, stehen unter einem doppelten Stress: Die hohe Salzkonzentration im Boden erschwert die Wasseraufnahme und belastet den Zellstoffwechsel infolge veränderter Natrium-, Kalium- und Chloridionenkonzentrationen.

Die Enzyme von Wildpflanzen, die an salinen Standorten wachsen können (Halophyten), sind empfindlich gegen Salz, was vermuten lässt, dass Halophyten fähig sind, Na^+ -Ionen vom Cytoplasma fernzuhalten. Dafür gibt es mehrere Mechanismen: 1. Der Natriumausschluss wird dadurch verwirklicht, dass die äußere Membran der Pflanzenzelle, das Plasmalemma, den Eintritt von Na^+ -Ionen bis zu einem gewissen Grad zu verhindern vermag. 2. Die Natriumexkretion wird durch ins Plasmalemma eingebettete Ionenpumpen bewirkt. Das sind Proteine oder Proteinkomplexe, welche Na^+ -Ionen im Austausch gegen H^+ -Ionen aus der Zelle herausbefördern und deshalb als Na^+/H^+ -Antiporter bezeichnet werden. 3. Die Natriumkompartimentierung ermöglichen funktionell gleichwertige Transporter im Tonoplasten, der inneren Plasmamembran, welche das Cytoplasma ausdifferenzierter Pflanzenzellen gegen den zentralen Saft Raum, die Vakuole, abgrenzt. Sie sind geometrisch so im Tonoplasten orientiert, dass Na^+ -Ionen aus dem Cytoplasma entfernt und in der Vakuole angereichert werden. Dadurch verbessert sich nicht nur die Salztoleranz sondern auch die Saugkraft der Zelle und damit der Schutz vor Trockenheit.

Die Antiporter werden wie andere Membranproteine an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und anschließend in definierter Orientierung in das Plasmalemma bzw. den Tonoplasten eingebaut. Die Transportleistung hängt von der Aktivität des Transporters ab, jedoch auch von ihrer Dichte, d. h. der Zahl der pro Membranflächeneinheit eingebauten Transportermoleküle. Die Überexpression vakuolärer Na^+/H^+ -Transporter sollte deshalb die Na^+ -Akkumulierung in der Vakuole steigern und dadurch die Salztoleranz verbessern können. AtNHX1 ist ein gut charakterisierter vakuolärer Na^+/H^+ -Antiporter von *Arabidopsis thaliana*. Wird er in Modellpflanzen oder im Raps überexprimiert, so zeigt sich, dass die transgenen Pflanzen noch bei einer Natriumchloridkonzentration von 200 mM wachsen können ([Zhang u. a. 2001](#)). Auch beim Mais, der nur eine geringe natürliche Salztoleranz besitzt, kann die Salzverträglichkeit durch konstitutive Expression von AtNHX1 wesentlich verbessert werden.

Wie Feldversuche mit AtNHX1 exprimierendem Hybridmais zeigen, ist dieser unter Salzstressbedingungen konventionellem Mais in mehrerer Hinsicht überlegen. Das Tausendkorngewicht der Biotechsorte ist 13 - 23% höher als beim Wildtyp. 20 Tage nach Beginn der Salzbehandlung ist die oberirdische Biomasse mancher transgener Linien 50 - 60% höher. In Gegenwart von 0,4% NaCl keimen noch 83% der Biotechsamen, aber nur 50% der konventionellen Samen. Die Transgeniker akkumulieren in Blättern und Wurzeln auch deutlich mehr Natrium- und Chloridionen als der Wildtyp, und wie bei anderen transgenen AtNHX1 exprimierenden Pflanzen (Tomate, Raps) sind diese Ionenkonzentrationen mit dem Salzstress korreliert ([Li u. a., 2010](#)).

3.4.2 Verbesserung der Ernährungsqualität

3.4.2.1 Senkung des Phytinsäuregehalts des Korns

Eigenschaften und Funktionen der Phytinsäure

Phytinsäure (Inositolhexakisphosphat) ist der Hexaphosphorsäureester des Inositols (Cyclohexanhexols), eines sechswertigen zyklischen Alkohols. In der Natur kommt Phytinsäure als Anion (Phytat) vor und ist bei Pflanzen und Tieren weit verbreitet. Besonders viel Phytat ist in Mais-, Soja-, Weizen- und Gerstenkleie enthalten, aber nicht in Roggenkleie. Getreidekörner und Ölsaaten enthalten große Mengen von Phytinsäure. Mais allein produziert weltweit jährlich 4,8 Mt Phytinsäure. Phytinsäure gehört zu den bioaktiven Substanzen und beteiligt sich an der Steuerung vieler Zellfunktionen in der Individualentwicklung, der Stressbewältigung, Homöostase, Phosphatwahrnehmung, DNA-Reparatur, RNA-Verarbeitung und dem RNA-Export.

Mit ein- und zweiwertigen Kationen (Kalium-, Magnesium-, Calcium-, Mangan-, Barium- und Eisenionen) bildet Phytinsäure Komplexsalze (Chelate). Phytinsäure enthält den überwiegenden Teil des Phosphats in Samen. Sie dient dem Samen als Speicher für Phosphat und Ionen, die der Keimling zum Wachstum braucht. Bei der Keimung werden Mineralien und Phosphat durch das Enzym Phytase freigesetzt, welches Phytinsäure in Inositol und Phosphat zerlegt. Phytasen kommen nicht nur bei Pflanzen, sondern auch bei Tieren und Mikroorganismen vor. Die Biosynthese von Phytinsäure findet im Cytoplasma der Zellen des Keimblattgewebes statt und beginnt mit der Synthese des Inositols, welches dann schrittweise phosphoryliert wird. Es sind mehrere Pflanzengene isoliert worden, welche an der Synthese der Phytinsäure beteiligte Enzyme kodieren. Im Samen wird Phytinsäure als Mischsalz in Form submikroskopischer Einschlusskörper abgelagert, welche sich in den Proteinspeichervakuolen der Zellen der Keimblätter (Cotyledonen) des Embryos befinden.

Ernährungsphysiologie von Phytinsäure und Phosphat

Phosphor ist Bestandteil sehr vieler Biomoleküle, und ausreichende Phosphorversorgung ist für alle Organismen lebenswichtig. Phytinsäure ist die Hauptspeicherform von Phosphor in vielen Samen. Der an sich für die menschliche und tierische Ernährung ausreichende Phosphorgehalt von Getreide und Ölsaaten ist größtenteils als Phytat gebunden. Er kann nur von Rindern und anderen Wiederkäuern genutzt werden. Im Pansen des Rinds lebende Mikroorganismen ermöglichen nicht nur die Verdauung von Zellulose, sondern bilden auch Phytase, welche die Phytinsäure in Inositol und anorganisches Phosphat (P_i) zerlegt. Nicht wiederkäuende (monogastriische) Tiere können als Phytat gespeicherten Phosphor kaum verwerten, da sie im Verdauungstrakt nicht genug Phytase bilden, um den Phosphor zugänglich zu machen.

Aufgrund ihrer komplexbildenden Eigenschaften kann Phytinsäure vom Menschen mit der Nahrung aufgenommene Mineralstoffe im Magen und Darm wie Calcium, Magnesium, Eisen und Zink unlöslich binden, so dass sie dem Körper nicht mehr zur Verfügung stehen. Sie interagiert auch mit basischen Aminosäuren, Samenproteinen und Enzymen im Verdauungstrakt, bildet mit diesen Molekülen Komplexe und vermag dadurch die Verfügbarkeit von Aminosäuren, die Proteinverdauung und die Aktivität von Verdauungsenzymen einzuschränken. Phytat kann daher echte Mangelerscheinungen verursachen, wenn es in reinem Zustand oder in großen Mengen gegessen wird, was bei einseitiger Ernährung von Sojaerzeugnissen vorkommen kann. In den Entwicklungsländern trägt der Phytinsäuregehalt von Nahrungsmitteln, die auf Körnern und Ölsaaten basieren, zu Eisen- und Zinkmangelerscheinungen bei, von denen täglich hunderte von Millionen Menschen betroffen sind. In einer ausgewogenen Mischkost stellt Phytinsäure keinen wesentlichen Nachteil dar, sondern gilt heute eher als gesundheitsfördernd. Sie verzögert den Stärkeabbau und erleichtert dadurch die Konstanthaltung der Blutzuckerkonzentration. Zudem vermag sie überschüssige Metallionen, vor allem Eisen, in der Nahrung zu binden, welches hauptsächlich bei Konsum von rohem Fleisch ein erhöhtes Risiko für Darmkrebs darstellen könnte.

Gewässerverschmutzung durch Phosphat

Kommerziell aufgezogene monogastriische Tiere (Schweine, Geflügel, Fisch) geben von Phytinsäure stammende phosphatreiche Abfälle ab. Dies ist der Grund dafür, dass Gülle vom Schwein und anderen Haustieren soviel Phosphat enthält. Die unverdaut ausgeschiedene Phytinsäure wird als Hauptquelle der Phosphatverschmutzung und Eutrophierung der Gewässer durch die Landwirtschaft angesehen und führt in dichtbesiedelten Gebieten immer wieder zu Entsorgungs- und Umweltproblemen.

3.4.2.2 Wege zur Verbesserung des Phosphatangebots

Zusatz von Phosphat oder bakteriellen Phytasen zum Futter

Um die Nahrungsansprüche von Schweinen und Geflügel zu befriedigen, ergänzt man Tierfutter oft entweder mit anorganischem Phosphat, das aus Gesteinsmehl stammt oder durch Zugabe von Phytase aus Mikroorganismen. Zur Ergänzung von Futtermitteln für Schweine und Geflügel ist eine rekombinierte Phytase aus dem Pilz *Aspergillus niger* auf den Markt gebracht worden, welche pH-Optima bei pH 2 und pH 5,5 besitzt und im Verdauungstrakt dieser Tiere gut wirksam ist. Ihre Zugabe verbessert die Phosphatausnutzung und verringert die Phosphatausscheidungen der Tiere. Das Enzym kann im Tabak exprimiert werden und macht im Samen dann 1% der löslichen Proteinfraction aus. Die Ergänzung von Futtermitteln für Hühner mit den transgenen Samen verbessert die Wachstumsrate, und der Effekt ist mit dem Zusatz von Phosphat oder Phytase zum Futter vergleichbar.

Laborstudien haben gezeigt, dass transgene Schweine, die eine bakterielle Phytase exprimieren, phytinsäuregebundenen Phosphor mit hoher Effizienz nutzen und weniger Phosphat ausscheiden als ihre nicht transgenen Verwandten. Vorerst bleibt jedoch der Zusatz von anorganischem Phosphat oder Phytase zum Tierfutter die Methode der Wahl. Da die Supplementierung kostspielig ist, wird versucht, das Problem an der Wurzel anzupacken, indem man Pflanzen züchtet, deren Samen einen möglichst niedrigen Phytinsäuregehalt haben. Der Anbau solcher Pflanzen würde Mangelercheinungen entgegenwirken, die Herstellung von Futtermitteln verbilligen und die negativen Umweltauswirkungen der intensiven kommerziellen Tierproduktion reduzieren.

Mutationszüchtung

Seit Beginn der 90er Jahre sind phytinsäurearme *lpa* (low phytic acid) -Mutanten, die P_i akkumulieren, ohne dass sich der Gesamtphosphorgehalt verändert, in allen wichtigeren Ackerpflanzen gefunden worden. In Samen, die von Pflanzen stammen, welche homozygot für ein gegebenes *lpa*-Allel sind, wird ein um 50 - 95% niedrigerer Phytinsäuregehalt beobachtet, der fast immer von einer Zunahme des Gehalts an anorganischem Phosphat begleitet ist. So zeigt eine 2002 gefundene *lpa*-Mutation im MIPS-Gen der Sojabohne (gmMIPS1) einen um 50% niedrigeren Phytinsäuregehalt als der Wildtyp. Der Gehalt an anorganischem Phosphat ist entsprechend erhöht. Das Produkt des *gmMIPS1*-Gens, Inositol-1-Phosphatsynthase, katalysiert die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in Inositol-1-Phosphat, welches durch nachfolgende Phosphorylierungen in Phytinsäure überführt wird. Die Samen der Mutante haben auch einen geringeren Gehalt an Galactinol und schlecht verträglichen Raffinosiden. In den Samen des Wildtyps entstehen diese Verbindungen in größeren Mengen aus Inositol, welches durch Dephosphorylierung von Inositol-1-Phosphat gebildet wird. Ernährungsstudien an Tieren haben bestätigt, dass *lpa*-Samen mehr verwertbaren Phosphor liefern und den Phosphorgehalt der Tierproduktion entstammender Abfälle senken können. Zudem verbessern *lpa*-Samen die Eisen-, Zink- Calciumversorgung bei Mensch und Tier.

Der züchterische Wert der bisher gefundenen *lpa*-Mutanten ist begrenzt, da die systematische Reduktion des Phytinsäurepegels im Samen gewöhnlich negative Auswirkungen auf die Qualität der Samen und der Pflanze hat. Sie zeigen sich unter anderem in gestauchtem Wuchs, verringerter Keimungsrate, geringerer Stresstoleranz, reduziertem Samengewicht oder gestörter Embryonalentwicklung. Die vollständige Stilllegung *gmMIPS1* durch RNA-Interferenz kann sogar zum Untergang der Sojaembryonen führen, obwohl die Mutterpflanze einen normalen Phänotyp zeigt. Wesentlich aussichtsreicher als die Mutantenzüchtung ist die Reduktion des Phytinsäuregehalts in den Samen mit gentechnischen Mitteln. Dabei sind gegenwärtig vor allem zwei Ansätze erkennbar: die Expression rekombinierter Phytasegene in den Keimblättern des Embryos und die Stilllegung von Genen, welche zur Synthese oder Speicherung der Phytinsäure erforderliche Enzyme oder Transportproteine kodieren.

Expression rekombinierter Phytasegene im Samen

Bereits 1993 erhielten [Pen u. a.](#) phänotypisch normale transgene Tabakpflanzen, welche das Phytasegen von *Aspergillus niger* unter Kontrolle des CaMV35S-Promoters exprimierten. Die Transgeniker enthalten ca. 1% Phytase in der löslichen Proteinfraction. Im Unterschied zur nativen *Aspergillus*-Phytase ist das im Tabak gebildete Enzym nicht glykosyliert, was dessen Aktivität jedoch nicht beeinträchtigt. Tierfutter, welches mit den transgenen phytasehaltigen Tabaksamen angereichert wurde, zeigt bei Hühnern eine deutlich wachstumsfördernde Wirkung. Sie ist vergleichbar mit Futtermitteln, die kommerzielle Präparationen von Phytase aus

Aspergillus niger enthalten und wesentlich höher als bei nicht mit Phytase oder P_i angereicherten Futtermitteln. Im Samen ist die transgene Phytase recht stabil und zeigt auch nach einjähriger Lagerung bei Zimmertemperatur keine Aktivitätsabnahme.

Auch bei Mais und Soja kann der Phytatgehalt des Samens durch die Expression heterologer Phytasen drastisch reduziert werden. Man kennt transgene Maislinien, welche in den Keimblättern des Embryos das *phy2A*-Gen von *Aspergillus niger* exprimieren. Das Gen steht unter Kontrolle des Globulin-1-Promoters, eines embryo-spezifischen Promoters des Mais. Die nur im Embryo beobachtete Expression der *Aspergillus*-Phytase erhöht die Phytaseaktivität im Korn gegenüber gewöhnlichen Maispflanzen etwa um das 50fache. Das Gen kann auch in transgener Hefe exprimiert werden. Vergleicht man die elektrophoretische Beweglichkeit der in Hefe bzw. Mais gebildeten *Aspergillus*-Phytasen, findet man, dass das Maisprotein etwas kleiner ist als das Hefeenzym, was wahrscheinlich auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster zurückgeht. Das neue Merkmal ist genetisch stabil und bewirkt eine deutliche Senkung des Phytinsäuregehalts im Korn bei gleichzeitiger Erhöhung des Gehalts an freiem biochemisch verfügbarem Phosphat im Samen ([Chen u. a., 2008](#)). In China, wo 500 Mio. Schweine (50% des Weltbestands) und 13 Mrd. Hühner und anderes Geflügel gehalten werden, ist ein im Land entwickelter Phytase-Biotechmais zum Anbau zugelassen und steht kurz vor der Markteinführung ([James, 2015](#)). Man kennt rekombinierte Varianten der Phytase aus *Aspergillus niger* mit höherer Temperaturstabilität und besserer katalytischer Wirksamkeit. Durch Expression dieser Enzyme dürfte sich die Phytinsäureverwertung optimieren lassen, so dass sich der Zusatz von Phosphat oder Phytase zum Mehl vermutlich eines Tages erübrigen wird.

Auch der Eisengehalt des Maiskorns ist zu gering. Die Expression heterologer Phytasen lässt sich mit derjenigen des eisenbindenden Proteins Ferritin kombinieren. Maispflanzen, welche zusätzlich Ferritin im Korn bilden, haben einen wesentlich höheren Eisengehalt. Die Expression rekombinierter Phytase- und Ferritingene in transgenem Mais könnte somit genutzt werden, um Phosphat- und Eisenmangel, wie er vor allem bei vegetarischer Ernährung leicht auftreten kann, vorzubeugen ([Drakakaki u. a., 2005](#)).

Eingriffe in Phytinsäuresynthese und -transport

Die Biosynthese der Phytinsäure ist überwiegend cytoplasmatisch und beginnt mit der Synthese von Inositol aus Glucose-6-Phosphat durch Inositolphosphatsynthase und Inositolmonophosphatase. Durch Inositolkinase und Inositolpolyphosphatkinase wird Inositol schrittweise zu Phytinsäure phosphoryliert. Das Phytat verbleibt nicht im Cytoplasma, wo es gebildet wird, sondern wird in die im Plasma eingelagerten Proteinspeichervakuolen gepumpt, wo es als Mischsalz abgelagert wird. Den Transport bewirkt ein membrangebundener, vermutlich in der Vakuolenmembran verankerter ABC-Transporter, welcher das Phytat bindet und unter ATP-Verbrauch gegen das Konzentrationsgefälle in die Speichervakuolen pumpt. ABC-Transporter ([Dean, 2002](#)) sind eine Klasse von Membranproteinen, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette (ATP binding cassette, ABC) besitzen und spezifische Substrate aktiv durch eine biologische Membran transportieren. Wenn die Substrate von ABC-Transportern gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden, muss für den Vorgang Energie aufgewandt werden. Das geschieht durch Bindung und Hydrolyse von ATP an der ABC-Einheit. Die ABC-Transporter-Superfamilie umfasst eine der größten bekannten Proteinfamilien mit Mitgliedern in fast jedem Organismus. Die ABC-Transporter rückten in den letzten Jahren ins Rampenlicht, als erkannt wurde, dass sie eine beträchtliche medizinische, industrielle und ökonomische Bedeutung haben. So spielen sie eine große Rolle bei Resistenzen von Bakterien gegen Antibiotika und Antimykotika. Bei Pflanzen verursachen sie Resistenz gegen manche Herbizide. Die *lpa1-1*-Mutante des Mais trägt eine Mutation im ABC-Transportergen für Phytat. Von den drei Klassen der Mais-*lpa*-Mutanten haben *lpa1*-Mutanten den niedrigsten Phytinsäuregehalt. Ca. 75% des Gesamtphosphors in Samen von *lpa1-1*-Mais ist monogastrischen Tieren zugänglich gegenüber nur 25% beim Wildtyp. Abhängig von der Futterzusammensetzung reduziert die Substituierung normaler Maiskörner mit *lpa1-1*-Mais den Phosphor in der Gülle um 10-85%. Ernährungsstudien am Menschen zeigten, dass *lpa1-1*-Mais die Bioverfügbarkeit von Fe^{2+} , Zn^{2+} und Ca^{2+} verbessert. Leider wird der züchterische Wert der *lpa*-Mutanten durch Negativmerkmale wie gestörte Samenentwicklung, reduziertes Samengewicht und gestauchtes Wachstum stark gemindert. Das *lpa1*-Gen des Mais besteht aus 11 Exonen und kodiert ein Protein mit einer Länge von 1510 Aminosäuren. Das Protein hat 2 Module. Jeder besteht aus einer Transmembrandomäne und einer cytosolischen ATP-Bindungsdomäne, die beim membranverankerten Protein dem Cytoplasma zugekehrt ist. Bei der *lpa1*-Mutante findet man an der Position 1432 der Polypeptidkette die Aminosäure Valin anstelle des Alanins des Wildtyps. Diese Ala-Val-Substitution ist höchstwahrscheinlich die Ursache des *lpa1*-Phänotyps. Der Transporter wird vorwiegend in Embryonen exprimiert, aber auch in anderen Geweben sowohl im Samen als auch in den vegetativen Pflanzenteilen. Die Klonung von *lpa1* ermöglichte die

Entwicklung von RNA-Interferenz-Konstrukten, welche mit dem Ziel in den Mais und auch die Sojabohne eingeführt wurden, die Expression des *lpa1*-ABC-Transporters zu unterdrücken und die Auswirkungen dieser Suppression auf den Phytinsäure- und P_i -Gehalt der Samen beobachten zu können. Die vielversprechendsten Ergebnisse erhielt man mit Transgenkassetten, bei denen die kodierende Sequenz des Transportergens mit embryospezifischen Promotoren wie dem Globulin-1-Promoter (Mais) oder dem Promoters eines Trypsininhibitor-Gens (Soja) kombiniert worden war ([Raboy, 2007](#); [Shi u. a., 2007](#)). Beim Mais reduziert die embryospezifische Suppression von *lpa1* den Phytatgehalt um 32% - 37%, bei der Sojabohne um 37% - 90%. In beiden Fällen ist die Verringerung des Phytatgehalts mit einer äquivalenten Zunahme des P_i -Gehalts korreliert. Inositolzwischenprodukte der Phytinsäuresynthese sind in den Transgenikern nicht mehr nachweisbar. Nach bisher vorliegenden Feldversuchen sind die besten Linien den bekannten *lpa*-Mutanten agronomisch deutlich überlegen, da sie nicht deren negative Begleitmerkmale zeigen. Dies ist insofern verständlich, als das *lpa1*-Gen bei den transgenen Linien im Gegensatz zu den Mutanten nur in den Keimblättern ausfällt und der Inositolstoffwechsel in allen anderen Geweben und Organen unbeeinflusst bleibt.

Die gewebespezifische Abregelung des Phytattransports weist einen weiteren Weg zur Steigerung der Ernährungsqualität von Mais- und Sojasamen. Das Anwendungspotential dieser Technik ist jedoch geringer als bei der Expression rekombinierter Phytasen im Samen, da Phytinsäure, die in beigemischten Mehlen konventioneller Herkunft enthalten ist, so nicht verwertbar gemacht werden kann.

3.4.2.3 Verbesserung der Proteinqualität

Wie die bereits vermarktete Sorte LY038 zeigt, kann der Lysinmangel des Maiskorns durch Eingriffe in die Regulation der Lysinsynthese verringert werden. Davon abgesehen werden noch weitere Möglichkeiten untersucht. Das *sb401*-Gen von *Solanum berthaultii*, einer in Bolivien beheimateten Wildkartoffel, kodiert ein pollenspezifisches Protein mit besonders hohem Lysingehalt. Wird es mit dem Promoter eines samenspezifischen Speicherproteins gekoppelt und in den Mais eingeführt, so erhält man ein Korn, in dem der Lysingehalt um 16% - 55% und der Gesamtproteingehalt um 12% - 39% erhöht ist. Im Gegensatz zu LY038 wird hier nicht der Gehalt an freiem Lysin erhöht, sondern der des proteingebundenen Lysins bei gleichzeitiger Steigerung des Proteinanteils im Korn. Nach bisher vorliegenden Bonitätsprüfungen und Kreuzungsbefunden sind die Pflanzen phänotypisch normal und genetisch stabil ([Yu u. a., 2005](#)). Auch die Expression eines Milchproteins (α -Lactalbumin) im Endosperm des Maiskorns bewirkt eine Steigerung des Lysingehalts und eine insgesamt ausgeglichene Aminosäurezusammensetzung der Maisspeicherproteine ([Bicar u. a., 2007](#)).

Multivitaminmais

Nahezu die Hälfte der Weltbevölkerung leidet an Mangelerscheinungen und Krankheiten, die durch Mangel an Vitaminen und anderen lebensnotwendigen Nahrungsbestandteilen verursacht werden. In vielen Entwicklungsländern ernährt sich der größte Teil der Bevölkerung nahezu ausschließlich von Getreideprodukten, denen bestimmte Vitamine und essentielle Mineralstoffe fehlen. Im Getreidekorn entstehen diese Defizite dadurch, dass die erforderlichen Stoffwechselwege unvollständig oder unterdrückt sind oder fehlen. Konventionelle Züchtungsprogramme zur Vervollständigung der Nährstoffzusammensetzung haben bisher nur marginale Erfolge erzielt. Dagegen zeigen viele erfolgreiche Transformationsexperimente mit Modell- und Nutzpflanzen, dass eine gentechnische Optimierung des Pflanzenstoffwechsels möglich ist, indem Gene übertragen werden, welche die fehlenden Enzyme kodieren und nicht durch pflanzeigene Rückkopplungsmechanismen wie die Endprodukthemmung blockiert werden.

Das erste Beispiel einer erfolgreichen gentechnischen Stoffwechselmodifizierung war der bekannte β -Carotin bildende Goldene Reis ([Paine u. a., 2005](#)). Heute kennt man u. a. auch transgene Kartoffeln mit erhöhtem β -Carotingehalt, eisenangereicherten Salat und Lycopin bildende Tomaten ([Davies, 2007](#)). Gemeinsam ist diesen Beispielen, dass die Pflanzen jeweils nur in einem Merkmal verbessert sind. Fortgeschrittene Transformationstechniken erlauben die simultane Modifizierung mehrerer Stoffwechselwege durch gleichzeitige Übertragung mehrerer Enzymgene auf ein- und dieselbe Pflanze. [Naqvi u. a. \(2009\)](#) erhielten durch biolistische Transformation von Maisembryonen transgene Maispopulationen, welche im Endosperm erhebliche Mengen der (Pro)-Vitamine β -Carotin, Ascorbinsäure und Folsäure kodieren. Zwei Wochen alte Embryonen der südafrikanischen weißen Maisvarietät M37W wurden hierzu mit Metallpartikeln beschossen, die mit Plasmiden beschichtet waren, welche die kodierenden Sequenzen (cDNAs) 5 verschiedener Gene trugen, des *bar*-Gens, welches als Selektionsmarker diente, und von 4 weiteren Genen für Enzyme jeweils eines Schritts der Synthesewege für die drei genannten Verbindungen. Zur Komplettierung der β -Carotinsynthese diente eine

Phytoensynthese-cDNA des Mais, gekoppelt mit dem Glutenpromoter des Weizens, und eine Carotindesaturase-cDNA aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *Pantoea ananatis*, gekoppelt mit einem Hordeingen der Gerste. Glutene und Hordeine sind Speicherproteine, die im Samen von Weizen bzw. Gerste gebildet werden. Zur Steigerung des Ascorbinsäurespiegels wurde die cDNA der Dehydroascorbatreduktase des Reis eingesetzt und zur Erhöhung des Folsäurepegels die *folE*-cDNA von *E. coli*, welche eine GTP-Zyklohydrolase kodiert. Beide Gene standen unter Kontrolle des Hordeinpromoters. Die Regeneration transgener Pflanzen aus dem behandelten Gewebe auf selektivem phosphinothricinhaltigem Medium lieferte Pflanzen, von denen einige alle 5 Fremdgene exprimieren.

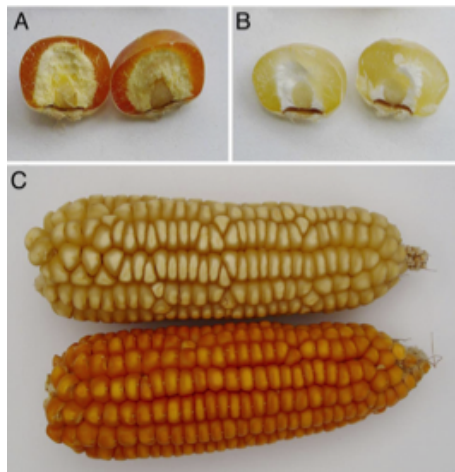


Abb. 50. Carotinanhäufung im transgenen M37W-Multivitaminmais. orange-gelber (A) und weißlich-gelber (B) Phänotyp transgener und gewöhnlicher M37W-Maiskörner; C Kolben von transgenem Multivitaminmais und konventionellem weißem Mais (Naqvi u. a., 2009. PNAS 106:7762-7767)

Weißer, nahezu carotinfreier Mais ist die im südlich der Sahara gelegenen Teil Afrikas vorwiegend gegessene Maisvarietät. Der in westlichen Ländern zur menschlichen Ernährung angebaute gelbe Mais dient dort meist als Tierfutter. Die Körner der besten transgenen M37W-Maislinien, welche die im konventionellen weißen Mais nicht gebildete Mais-Phytoensynthese und bakterielle Carotindesaturase exprimieren, sind tief orange gefärbt (Abb. 50) und enthalten 60 µg/g β-Carotin, mehr als das 100-fache der nicht transgenen Ausgangssorte und etwa doppelt soviel, wie der von Paine u. a. (2005) entwickelte Goldene Reis II. Gleichzeitig erhöht die Expression der Reis-Dehydroascorbatreduktase den Ascorbinsäuregehalt der Körner um das sechsfache. Schließlich verdoppelt die Expression von *folE* aus *Escherichia coli* den Folsäuregehalt der Körner auf ca. 2 µg/g Trockengewicht, was etwa dem Folsäuregehalt beim konventionellen gelben Mais entspricht. Der Gehalt an den drei Vitaminen ist so hoch, dass eine typische Tagesration von 100 - 200 g der neuen Sorte ausreicht, um den empfohlenen Tagesbedarf von β-Carotin und Folsäure vollständig und den Bedarf an Vitamin C zu 20% zu decken. Weiterentwicklungen in dieser Richtung werden es vermutlich eines Tages ermöglichen, transgene Getreidesorten zu bekommen, deren Mehl alle essentiellen Nährstoffe in genügender Menge enthält, und Zusätze entbehrlich machen. Solche Pflanzen gibt es bisher nicht, und es ist auch nicht ausreichend geklärt, ob die angereicherten Vitamine und Mineralstoffe vom Menschen auch ausreichend aufgenommen werden können. Einzelne Ernährungsstudien deuten darauf hin, dass dies der Fall sein könnte (Morris u. a., 2008).

Sicher ist, dass sich die Ernährungseigenschaften von Nahrungspflanzen durch den Einsatz der Gentechnik ganz wesentlich verbessern lassen und die Möglichkeiten der herkömmlichen Pflanzenzüchtung dabei weit übertroffen werden.

3.4.3 Produktion bioaktiver Proteine und Peptide

3.4.3.1 Industrieenzyme und Hormone

Die Produktion von Grundstoffen für die pharmazeutische, kosmetische und kunststoffverarbeitende Industrie in transgenen Pflanzen gehört zu den wichtigsten Zielsetzungen der Pflanzenbiotechnologie. Seit etwa 1999 sind zwei in biochemischen Laboratorien viel gebrauchte rekombinierte Proteine auf dem Markt, die in transgenem Mais produziert werden: Avidin, ein Protein aus Hühnereiweiß und β-Glucuronidase, ein bakterielles Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels (Hood u. a., 1999). Laccase aus dem Pilz *Trametes versicolor*, eine Lignin abbauende Peroxidase, und hitzebeständige Cellulase aus dem thermophilen Bakterium *Acidothermus cellulolyticus*, werden ebenfalls im Mais produziert. Diese beiden Enzyme können in der Zellulose- bzw. Bioethanolproduktion eingesetzt werden und die weitaus teureren in mikrobiellen Fermentern produzierten Enzyme ersetzen (Naqvi u. a., 2011). Auch das menschliche Proinsulin, die Vorstufe des Insulins, lässt sich nicht nur in transformierten Bakterien sondern auch im Endosperm transgener Maiskörner produzieren (Farinas u. a., 2005).

3.4.3.2 Antigene

Beachtliche Anfangserfolge gibt es auch bei der Züchtung transgener Mais- und anderer Kulturpflanzen, welche Antigene produzieren, mit denen bei oraler Anwendung eine aktive, die Bildung körpereigener Antikörper

auslösende, Schutzimpfung gegen gefährliche Infektionskrankheiten möglich ist. Die Produktion von Impfstoffen in Pflanzen hat gegenüber derjenigen in Tieren oder Mikroorganismen deutliche Vorteile. Die Gefahr einer Kontaminierung des Impfstoffs mit Allergenen, Viren oder Prionen ist weitaus geringer. Wenn der Impfstoff in den essbaren Teilen einer Nutzpflanze gebildet wird, entfällt die meist aufwendige Reinigung. Die Produktion in Pflanzen ist billig und kann leicht hochgefahren werden, wenn Bedarf besteht. Der Impfstoff ist leicht anzuwenden und deshalb auch in Ländern ohne entwickelte hygienische und medizinische Infrastruktur leicht einsetzbar ([Daniell u. a., 2001](#); [Giddings u. a. 2000](#)).

Manche Stämme des an sich harmlosen Darmbakteriums *E. coli*, darunter ETEC (enterotoxisches *E. coli*) und EHEC (enterohämorrhagisches *E. coli*) sind gefährliche Krankheitserreger. ETEC ist eine der häufigsten Ursachen von Reisedurchfallerkrankungen. In den Entwicklungsländern führt die Erkrankung bei jüngeren Kindern nach Dehydrierung leicht zum Tod. ETEC-Stämme bilden verschiedene Toxine, welche sich in der Hitzestabilität unterscheiden. Das hitzelabile LT-Toxin hat eine Molekülmasse von 73 kDa und besitzt zwei Domänen A und B. Die Aktivierungsdomäne A aktiviert die Enzyme Adenylatzyklase und Guanylatzyklase. Die Bindungsdomäne B besteht aus 5 Untereinheiten und bindet ein Zellmembranprotein (Gangliosid) der Darmepithelzellen. Das Toxin des ETEC-Stamms kommt ursprünglich von einem lysogenen Bakteriophagen. Gegen LT-B gerichtete Antikörper können die Bindung des Toxins ans Darmepithel verhindern und so vor der Erkrankung schützen. Man kennt einen Biotechmaisprototyp, welcher im Endosperm die LT-B-Untereinheit, welche nicht toxisch ist, produziert. Wie mit dem entfetteten Maismehl dieser Sorte durchgeführte Fütterungsversuche an Labormäusen zeigen, ist das Protein im Verdauungstrakt der Tiere stabil und induziert sowohl in der Darmschleimhaut (Mucosa) als auch im Blut-Lymphsystem starke Immunantworten. Nach Verfütterung transgenen Maismehls zeigen die Tiere eine deutlich erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen LT und auch gegen das verwandte Toxin CT des Choleraerregers, welche beide bei oraler Verabreichung Durchfälle erzeugen ([Karaman u. a., 2006](#)). Vergleichbare Immunantworten zeigten sich auch in klinischen Studien mit freiwilligen Probanden, denen das transgene Maismehl verabreicht wurde ([Tacket u. a., 2009](#)).

Die Newcastle-Krankheit (atypische Geflügelpest) ist eine weltweit verbreitete außerordentlich ansteckende Viruserkrankung, die Hühner, Truthühner und, seltener, auch andere Vogelarten befällt. Das Krankheitsbild erinnert an die Geflügelpest (Vogelgrippe). Der Erreger ist das Newcastle-Disease-Virus (NDV), ein RNA-Einzelstrangvirus der Familie *Paramyxoviridae*. Das F-Protein (Fusionsprotein) des Virus ist ein funktionsnotwendiges Protein des Infektionsprozesses. Es ermöglicht die Verschmelzung (Fusion) der Virushülle mit der tierischen Zellmembran und damit das Eindringen der viralen RNA in die befallene Zelle. Wird das virale F-Gen mit dem Mais-Ubiquitinpromoter verknüpft und in den Mais übertragen, so bewirkt es die Akkumulation des F-Proteins im Maiskorn. Hühner, die mit diesen Maiskörnern gefüttert werden, bilden Antikörper, welche sie vor dem Angriff des NDV-Virus schützen. Der Schutz ist mit dem eines kommerziellen Impfstoffs vergleichbar ([Guerrero-Andrade u. a., 2006](#)). TGEV, das übertragbare Gastroenteritis-Virus (transmissible gastroenteritis virus), erzeugt bei jungen Schweinen Durchfallerkrankungen. Wenn man Jungschweine mit TGEV-Mais füttert, welcher ein TGEV-Antigen exprimiert, sind die Tiere gegen das Virus geschützt ([Howard, 2004](#)).

Wenn diese Entwicklungen auch noch nicht unmittelbar vor der Anwendungsreife stehen, so zeigen sie doch, dass es grundsätzlich möglich ist, im Mais voll funktionsfähige Antigene herzustellen, welche als essbare Impfstoffe gegen gefährliche Infektionskrankheiten verwendbar sind oder Maisfuttermittel zu entwickeln, welche vor Tierseuchen wie der Vogelgrippe zuverlässig schützen. Die Keulung ganzer Bestände, die mit den Tieren oft auch die wirtschaftliche Existenz der Züchter vernichtet und doch die Ausbreitung der Seuche allenfalls verlangsamen, aber nicht verhindern kann, wird dann der Vergangenheit angehören.

3.4.3.3 Antikörper

Ebenso wie die Herstellung von Antigenen ist auch die Produktion von Antikörpern in Pflanzen im Hinblick auf Kosten, Skalierbarkeit der Produktion und Anwendungssicherheit attraktiv. Antikörper werden für Vorbeugung, Behandlung und Diagnose vieler Krankheiten eingesetzt. In der molekularbiologischen und biomedizinischen Grundlagenforschung braucht man sie für eine Vielzahl analytischer Nachweismethoden. Vor allem an homogenen, rekombinierten Antikörpern besteht ein wachsender Bedarf, wobei die gegenwärtigen Produktionsverfahren mit Hilfe von Bakterien- oder Säugerzellkulturen einen gewaltigen Engpass bilden. Zum Beispiel müssen die beiden in der HIV-Bekämpfung wichtigen monoklonalen Antikörper 2F5 und 2G12 in Milligrammmengen eingesetzt werden, um wirksam zu sein. Um den Weltbedarf decken zu können, müsste man

sie im Tonnenmaßstab produzieren, was auf Produktionsplattformen, die mit Mikroorganismen oder tierischen Zellkulturen arbeiten, unrealistisch ist. Obgleich bereits frühe Transformationsexperimente an Modellpflanzen wie dem Tabak gezeigt haben, dass Pflanzen biologisch aktive Immunglobuline synthetisieren können ([Hiatt u. a., 1989](#)), ist die Produktion therapeutisch anwendbarer Antikörper in Pflanzen schwieriger als die von essbaren Impfstoffen. Dafür gibt es mehrere Gründe. Da in der Pflanzenzelle 4 verschiedene Peptidketten gleichzeitig synthetisiert und zum funktionsfähigen Immunglobulin assembliert werden müssen, sind die Ausbeuten oft noch zu gering. Bevor man einem Individuum Antikörper injiziert, müssen diese vollständig gereinigt werden, weil es sonst leicht zu unerwünschten Immunreaktionen kommt. Durch die aufwendige Reinigung verteuert sich die Produktion. Die immunogenen oder allergenen Eigenschaften eines Antikörpers hängen nicht nur von der Aminosäuresequenz seiner 4 Polypeptidketten ab, sondern auch von seinem Glykosylierungsmuster, d. h. der Art, Zahl und Anordnung der Zuckermoleküle, die nach der Synthese und Assemblierung der Peptidketten an das fertige Immunglobulinmolekül angeheftet werden, bevor dieses das weiße Blutkörperchen, in dem es gebildet wurde, verlässt. Wie man inzwischen weiß, ist das Glykosylierungsmuster in Pflanzenzellen gebildeter Immunglobuline von demjenigen, welches in Säugerzellen gebildete Immunglobuline aufweisen, stark verschieden. So weist ein rekombiniertes menschliches Immunglobulin der Klasse IgA1, wenn es im Maisendosperm gebildet wird, ein Glykosylierungsmuster auf, das dem der Extensine ähnelt. Das sind Strukturproteine, die regelmäßig in der pflanzlichen Zellwand vorkommen und einen auffallend hohen Gehalt an der Aminosäure Hydroxyprolin besitzen. Zwar sind die Glykosylierungsmuster möglicherweise ohne großen Einfluss auf Wirksamkeit und Spezifität eines Antikörpers. Pflanzentypische Glykosylierungsmuster könnten aber im Körper des Menschen als Allergene wirken, die therapeutischen Anwendungen im Wege stehen ([Karnoup u. a., 2005](#)). Hergestellt wurden Antikörper pflanzlicher Herkunft bisher vor allem im Tabak, aber auch in Kartoffel, Soja, Alfalfa, Reis und Mais. Allerdings sind darunter nur wenige, die für die Therapie am Menschen in Frage kommen. Ein im Tabak gebildeter rekombinierter IgG-IgA Antikörper gegen ein Oberflächenantigen von *Streptococcus mutans*, dem Hauptverursacher der Zahnkaries, hat sich bei lokaler Anwendung als ebenso wirksam erwiesen wie ein Antikörper, der von einer Mauszelllinie produziert wird, und kann die Rückbesiedelung der Zahnoberfläche durch die Bakterien wirksam verhindern ([Ma u. a., 1998](#)). Auch die erwähnten Anti-HIV-Antikörper 2F5 und 2G12 wurden bereits im Mais Korn produziert. Im Mais gebildete 2G12-Antikörper sind in der HIV-Therapie ebenso wirksam wie die aus tierischen Zellkulturen ([Ramessar u. a., 2008](#)). Verschiedene andere von Pflanzen gebildete Immunglobuline befinden sich in der klinischen Testphase. Einige Jahre werden vermutlich noch vergehen, bevor die ersten in Pflanzen produzierten Antikörper für die Therapie am Menschen zugelassen werden ([Daniell u. a., 2001](#); [Stoger u. a., 2005](#)).

4 Raps

4.1 Biologie

4.1.1 Morphologie

Der zur Familie der Kohlgewächse (*Brassicaceae*) gehörende Raps (*Brassica napus* L., Abb. 51) ist eine alte aus dem Mittelmeerraum stammende in zahlreichen Sorten kultivierte einjährige (Sommerraps) oder zweijährige (Winterraps) Ölpflanze. Die krautigen dicht beblätterten Stengel werden beim Sommerraps ca. 100 cm, beim Winterraps bis über 2 m hoch und entwickeln Nebentriebe. Alle Blätter sind blaugrün bereift. Der Winterraps entwickelt eine tiefgehende Pfahlwurzel mit Seitenwurzeln.



Abb. 51. Rapsfeld (Wikipedia).

Die goldgelben Blüten (Abb. 52) bilden eine lange lockere Traube, die von unten nach oben abblüht. Raps hat entomophile (Insekten anlockende) Blüten, die sowohl Selbst- als auch Fremdbefruchtung zulassen. Rapsblüten produzieren Nektar relativ hoher Zuckerkonzentration und sind nach Farbe, Duft und Struktur für Insekten, insbesondere Bienen, attraktiv. Auch andere Insekten wie Hummeln und Schwebfliegen spielen in manchen Regionen bei der Bestäubung von Rapsblüten eine wichtige Rolle. Die meisten insektenblütigen Pflanzen haben relativ große ($32 - 33 \mu\text{m}$ Ø) klebrige Pollenkörner, die nicht leicht durch den Wind verfrachtet werden. Im Gegensatz dazu ist der Pollen der Windblütler gewöhnlich klein und trocken und wird leicht vom Wind verweht. Rapspollen bildet insofern einen Sonderfall, als seine Eigenschaften zwischen denen des Pollens typischer Wind- und Insektenblütler liegen. Unter Feldbedingungen kann Rapspollen sowohl durch

blütenbesuchende Insekten als auch durch Wind übertragen werden. Rapspollen ist unter Laborbedingungen 1-7 Tage befruchtungsfähig. Während dieses Zeitraums nimmt die Befruchtungsfähigkeit stetig ab. Sie ist abhängig von den Umgebungsbedingungen, vor allem der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit. Im Freiland während der Rapsblüte beträgt sie möglicherweise nur 24 - 48 Stunden. Die Befruchtung resultiert im Feld zu 70% aus der Selbstbestäubung, weil jede Blüte so große Pollenmengen produziert, dass von Nachbarpflanzen stammender Pollen nicht konkurrieren kann.



Abb. 52. Rapsblütenstand (Wikipedia).

Die Rapsfrüchte sind 5 bis 10 cm lange Schoten (Abb. 53), in denen man jeweils 15 - 25 kugelige braun bis schwarzbraun aussehende 1-2 mm große Samen findet. Jede Rapspflanze bildet hunderte von Samen. 1 kg Rapssamen enthält ca. 250'000 - 300'000 Samen.

Optimale Keimungsbedingungen für Rapssamen sind 20 °C, hohe Bodenfeuchtigkeit und Licht. Im Gegensatz zu vielen anderen Pflanzen benötigt Rapssamen nach der Reifung anscheinend keine Ruheperiode (Dormanz), um keimfähig zu werden. Bei ungünstigen Außenbedingungen wie starken Temperaturschwankungen, Trockenheit, langer Dunkelheit oder mangelnder Sauerstoffzufuhr kann er aber in eine Ruheperiode eintreten, was man auch als sekundäre Dormanz bezeichnet. Bei langer Einwirkung von Dunkelheit und Wasserstress werden Rapssamen lichtempfindlich, was ihnen die Fähigkeit verleiht, schon nach Einwirkung sehr kurzer Lichtimpulse zu keimen. Die Entwicklung der sekundären Dormanz ist abhängig vom Genotyp und variiert bei europäischen und kanadischen Sorten. Raps vermehrt sich im Freiland nur durch Samen. Der Öl- und Proteingehalt der Samen ist sortenabhängig. Die Samen des Winterrapses enthalten 40 - 45% Rohfett und 20 - 25% Rohprotein. In den sogenannten Doppelnulsorten (00-Raps) und beim Canolaraps sind die unerwünschten Inhaltsstoffe Erucasäure und Glucosinolate auf züchterischem Wege entfernt worden (s. u.).

4.1.2 Systematik und Phylogenie

Die Familie der *Brassicaceae* (früher *Cruciferae*) hat ca. 375 Gattungen und 3'200 Arten. Die Gattung *Brassica* enthält wichtige Kulturpflanzen, aber auch bedeutende Unkräuter. Letztere findet man auch in den Gattungen *Raphanus*, *Sinapis*, *Hirschfeldia*, *Diploaxis* und *Sisymbrium*. Die Gattung *Brassica* hat ca. 100 Arten. Der Kulturraps, *Brassica napus*, ssp. *oleifera*, ist europäischen Ursprungs. Er ist eine amphidiploide Hybride und geht vermutlich auf Kreuzungen der eng verwandten Arten *Brassica oleracea* (Kohl) und *Brassica rapa* (Rüben, Stoppelrübe) zurück. Das haploide Rapsgenom besteht aus 19 Chromosomen und setzt sich aus 10 bzw. 9 Chromosomen der beiden Ausgangsformen zusammen.



Abb. 53. Erntereifer Körnererbsen (Wikipedia).

4.1.3 Rapskrankheiten, Schädlinge und Unkräuter

Raps wird von zahlreichen Pilzen befallen. Am wichtigsten ist *Leptosphaeria maculans*, der Erreger der Wurzelhals- und Stengelfäule. Die Übertragung erfolgt von Jahr zu Jahr über infizierte Stoppeln, wodurch die Keimlinge getötet oder der Ertrag älterer Pflanzen gemindert wird. Bedeutend ist auch *Sclerotinia sclerotiorum*. Der Pilz hat einen sehr großen Wirtsbereich von ca. 400 Arten, darunter Erbsen, Bohnen und viele andere. Zu nennen sind ferner die Erreger der Kohlhernie (*Plasmidiophora brassicae*) und der Rapsschwärze (*Alternaria brassicae*). Hinzu kommen verschiedene Viren. Auch Insekten und Milben spielen als Schädlinge im Rapsfeld eine bedeutende Rolle. Zu den verbreitetsten gehören in Europa der Rapsersdflö (*Psylliodes chrysocephalus*), der Rapsglanzkäfer (*Meligethes aeneus*), der Rapsstengelrüssler (*Ceuthorrhynchus napi*) und die Kohlschotengallmücke (*Dasineura brassicae*).

Bei der Unkrautbekämpfung im Rapsfeld bilden zweikeimblättrige Unkräuter, vor allem solche aus der Familie der Brassicaceen, das größte Problem. Es gibt keine Nachauflaufherbizide, die diese Unkräuter nach der Rapskeimung bekämpfen können. Die Samen mancher Brassicaceen vermögen Canolasaatgut zu kontaminieren, wodurch die Qualität infolge erhöhter Konzentrationen von Erucasäure und Glucosinolaten gemindert wird.

4.1.4 Konventionelle Rapszüchtung

Wegen seines Gehalts an toxischen Verbindungen: Erucasäure und Glucosinolaten, ist Raps ursprünglich als Nahrungsquelle weder für den Menschen noch für Tiere geeignet. Erucasäure führt bei Laborratten zur Verfettung des Herzmuskels und zu Herzfunktionsstörungen. Glucosinolate bewirken im Tierversuch Thymusvergrößerungen. In den 70er Jahren wurden infolge intensiver Züchtungsprogramme in mehreren Ländern Rapsgenotypen gefunden, die signifikant weniger von diesen Verbindungen enthalten. Sie wurden die Vorläufer der heutigen Doppelnull- und Canolarapsvarietäten. Die Veredelung der alten, aber als Nahrungspflanze ungeeigneten Kulturpflanze Raps zu Sorten, die ein hochwertiges Speiseöl und ein proteinreiches Tierfutter liefern, gehört zweifellos zu den großen Erfolgen der klassischen Pflanzenzüchtung. Auch die unten beschriebenen triazin- und imidazolinonresistenten Rapslinien erhielt man durch systematische Selektion und Kreuzung geeigneter Elternpflanzen.

Raps zeigt wie Mais den Heterosiseffekt; das heißt, durch Kreuzung reiner Linien erhaltene Bastarde sind ertragsstärker als ihre reinerbigen Elternpflanzen. Die zu Produktionszwecken angebauten Rapsvarietäten sind daher meist Hybriden. Bei der Erzeugung von Hybridsaatgut muss verhindert werden, dass sich die Kreuzungspartner selbst befruchten. Beim Mais ist dies leicht möglich, weil die Blüten eingeschlechtig sind und jede Pflanze nur einen einzigen männlichen Blütenstand an der Stengelspitze ausbildet, den man von Hand entfernen kann. Beim Raps ist die manuelle Entfernung der Staubblätter (Handemaskulation) wegen der Vielzahl kleiner Blüten, die man an jeder Pflanze findet, im Produktionsmaßstab nicht durchführbar. Viel Forschungsarbeit ist beim Raps auf die Entwicklung cytoplasmatischer männlicher Sterilitätssysteme (CMS-Systeme) verwandt worden, da sich diese bei anderen Arten bis jetzt als wirksamstes Werkzeug zur Produktion von Hybriden erwiesen haben. Bei der CMS liegt der die männliche Sterilität der Blüten verursachende genetische Defekt der MS-Linie gewöhnlich auf der DNA der cytoplasmatischen Mitochondrien. Es sind mehrere CMS-Systeme für den Raps verfügbar, von denen aber keines vollständig befriedigen kann. Vielfach werden sie durch

Störfaktoren wie Instabilität bei wechselnden Klimabedingungen oder partielle weibliche Sterilität der männlich sterilen Pflanzen oder der Restorerlinie für die Praxis unbrauchbar gemacht. Zudem fehlt es an Selektionsmarkern für die zur Reinerhaltung der MS-Linie erforderliche Abtrennung männlich fertiler von männlich sterilen Individuen. Seit 1995 sind transgene für die Hybridenzüchtung geeignete Canolalinien auf dem Markt, in denen ein gentechnisch erzeugtes nukleäres MS-System, das Barnase/Barstar-Sterilitätssystem, zur Anwendung kommt.

Schwerpunkte der konventionellen wie der gentechnischen Rapszüchtung sind gegenwärtig Linien mit Resistenz gegen verbreitet angewandte Herbizide, gegen Pilzkrankheiten und Schadinsekten und die Entwicklung männlich steriler Linien, welche zusammen mit den zugehörigen Restorerlinien die Hybridenzüchtung erleichtern. Weit fortgeschritten ist bereits die gentechnische Züchtung von Sorten mit veränderter Ölzusammensetzung. Ein höherer Gehalt an langkettigen Fettsäuren im Rapsöl würde die bei der Margarineherstellung sonst erforderliche Fetthärtung überflüssig machen. Ein größerer Anteil ungesättigter Fettsäuren im Rapsöl hätte gesundheitsfördernde Wirkungen. Das Gleiche gilt für eine Anreicherung mit dem fettlöslichen β -Carotin, der Vorstufe von Vitamin A. Die Erhöhung des Anteils bestimmter Aminosäuren in den Samenspeicherproteinen könnte das in den Ölpresen zurückbleibende Samenmehl zu einem wertvolleren Tierfutter machen.

4.1.4.1 Null- und Doppelnull-Raps

Nach intensiver Forschung und Züchtung gelang es 1974, den Null-Raps (0-Raps) auf den Markt zu bringen, der anstelle der einfach ungesättigten Erucasäure die für den menschlichen Organismus wesentlich besser verträgliche Ölsäure enthält. Nach weiterer Züchtungsarbeit wurde 1985 der Doppelnull-Raps („00-Raps“) vorgestellt, bei dem auch der Gehalt an Glucosinolaten sehr stark gesenkt werden konnte. Nach der Zusammensetzung der Fettsäuren kommt das 00-Rapsöl dem Olivenöl praktisch gleich. Der Anteil an essentiellen Fettsäuren, insbesondere der α -Linolensäure, ist noch um ein Mehrfaches höher.

4.1.4.2 Canola

Die in Kanada entwickelten und in ganz Nordamerika kultivierten Doppelnull-Rapssorten wurden ursprünglich aus Vermarktungsgründen als Canola (Canadian oil, low acid) bezeichnet. Mittlerweile wird Canola in weiten Teilen Amerikas und Australiens allgemein als Bezeichnung für Raps verstanden. Heute existieren zahllose Canolakultivare mit unterschiedlichen Ölprofilen. Jede Sorte ist auf ein bestimmtes Segment des Ölmarkts spezialisiert. Die Mehrzahl der heutigen großflächig angebauten Canola-Sorten ist transgen. Canolavarietäten müssen spezifischen Anforderungen im Hinblick auf den Gehalt an Erucasäure und Glucosinolaten genügen. Sie müssen ein Öl liefern, welches weniger als 2% Erucasäure enthält und ein ölfreies Mehl mit einem Gehalt von höchstens 30 $\mu\text{mol/g}$ an Glucosinolaten. Weltweit befinden sich derzeit fast ausschließlich Sorten im Anbau, die frei von Erucasäure und arm an Glucosinolaten sind.

4.1.4.3 Triazinintoleranter Raps

In Australien wird seit 1993 zunehmend eine triazinresistente Canolavarietät angebaut, die man durch Einkreuzung der natürlichen Triazinresistenz einer unkrautigen *Brassica-rapa*-Rasse in Canola erhielt. Ihr Ertrag ist geringer als bei den anderen Canolasorten, und die Anfälligkeit gegen die von dem Pilz *Leptosphaeria maculans* verursachte Wurzelhals- und Stengelfäule ist höher. Triazinherbizide werden im Boden nur langsam abgebaut. Zudem beobachtet man in Australien infolge langjähriger Anwendung von Triazin und Atrazin vor allem im Lupinenanbau das Aufkommen triazinresistenter Unkräuter wie des Steifen Weidelgrases (*Lolium rigidum*) und wilden Rettichs (*Raphanus raphanistrum*). Trotz dieser erheblichen Nachteile wurde triazinresistenter Canola in Australien von den Farmern bereitwillig übernommen und hatte 1999 einen Anteil von fast 50% an der gesamten Rapsanbaufläche. In Westaustralien waren es 1998 sogar 90%. Die Sorte wird meist deshalb gewählt, weil sich zweikeimblättrige Unkräuter, vor allem solche aus der Familie der Brassicaceen, in konventionellen Canolafeldern nur schwer bekämpfen lassen. Auch in den USA und Kanada findet man mit triazinresistenten Varietäten bestellte Canolafelder.

4.1.4.4 Imidazolinontoleranter Raps

In Kanada sind nicht transgene Canolalinien zum Anbau zugelassen, welche resistent gegen Imidazolinonherbizide (IT-Canola) oder im Fettsäureprofil verändert sind. IT-Canola wird auch in den USA und in Australien angebaut. Man erhielt diese Sorten aus konventionellem Canola durch Behandlung von Samen oder Pollenbildungszellen mit Ethylmethansulfonat (EMS) oder Ethylnitrosoharnstoff (ENU), starken Mutagenen, welche

DNA angreifen und dabei Punktmutationen induzieren. Das Saatgut wird zusammen mit einer Imidazolinonherbizidmischung auf den Markt gebracht. Im Gegensatz zu triazinresistenten Sorten zeigen diese Varietäten keine Minderung des Ertrags oder der Ölqualität. Imidazolinonherbizide gelten als risikoreich, was die Resistenzentwicklung angeht, und letztere ist in manchen Gegenden Australiens bereits beobachtet worden. Der landwirtschaftliche Nutzen von IT-Canola ist deshalb begrenzt.

4.1.4.5 Sommer- und Winterraps

Nach Vegetationsdauer und Anbauperiode unterscheidet man Sommerraps- und Winterrapsvarietäten. Den Winterrapsanbau findet man vorwiegend in maritimen Lagen West- Mittel- und Osteuropas. Die Aussaat erfolgt in der zweiten und dritten Augustwoche, die Ernte im Juli/August des Folgejahres. Wegen der begrenzten Frosthärte ist Winterraps nur bedingt für kontinentales Klima geeignet. Er verlangt tiefgründigen Boden mit guter Nährstoffversorgung. Den Sommerrapsanbau findet man in Kanada, China, Indien und Europa. Die Aussaat erfolgt möglichst früh im März/April. Geerntet wird im August. Der Sommerrapsanbau konzentriert sich vorwiegend auf die kontinental beeinflussten Klimazonen. Hinsichtlich der Bodenbeschaffenheit ist Sommerraps anspruchsloser als der Winterraps. Er verlangt aber eine gute Wasserversorgung.

4.2 Rapsproduktion

4.2.1 Produktions- und Ertragsvolumen

Der Rapsanbau ist in den letzten Jahren weltweit stark ausgedehnt worden. Nicht nur die Anbauflächen, sondern auch die Hektarerträge sind stark gestiegen. Die größten Rapsproduzenten sind gegenwärtig China, Kanada und Indien (Tab. 14). In der EU dürfen Landwirte Raps auf Stilllegungsflächen anbauen, wenn die Ernte ausschließ-

Land	Produktion (Mt)		Erträge (t/ha)	
	2008	2013	2008	2013
Kanada	12,8	17,9	1,94	2,23
China	12,1	14,4	1,83	1,92
Indien	5,83	7,82	1	1,23
Frankreich	4,72	4,37	3,32	3,03
UK	1,97	2,18	3,29	2,97
EU	18,99	21,02	3,08	3,12

Tab 14. Rapsanbau und Hektarerträge in verschiedenen Ländern ([FAOSTAT, 2016](#)).

lich im Nicht-Nahrungsmittelbereich genutzt wird. Sie können unter bestimmten Auflagen eine EU-Energiepflanzenprämie in Höhe von 45 Euro je Hektar Rapsanbaufläche erhalten, wenn sie Energiepflanzen auf Nicht-Stilllegungsflächen anbauen. Beides soll zusätzliche Einnahmen für die Landwirte schaffen und die Versorgung der Biodieselindustrie mit einheimischen Rohstoffen sichern. In Deutschland führten diese Fördermaßnahmen zu einer stark zunehmenden Nachfrage der Biodieselerzeuger nach Raps und zu einer starken Ausdehnung der Anbauflächen (Tab. 14). Im Jahr 2005 wurde Raps auf insgesamt rund 1,3 Millionen Hektar oder knapp 11% aller Ackerflächen angebaut. Auf mehr als zwei Dritteln der Rapsflächen, rund 900'000 Hektar im

Jahr 2005, wurde Raps für die Biodieselproduktion erzeugt. Weitere 100'000 Hektar liefern Raps für andere industrielle Verwendungszwecke, etwa technische Öle und Fette. Die restlichen Flächen dienten der Erzeugung von Raps für die Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Weit über die Hälfte des in Deutschland produzierten Pflanzenöls ist mittlerweile Rapsöl. In Kanada sind bereits 1999 auf 3,4 Mha transgene Canolasorten kultiviert worden, was 62% der damaligen kanadischen Rapsproduktion entspricht.

In den USA wurde auf vom übrigen Rapsanbau getrennten Anbauflächen auf 60'000 - 80'000 ha laurinsäureangereicherter Biotechrapssorten angebaut, der getrennt von der übrigen Rapsernte verwertet wird. In Australien ist der Rapsanbau zwischen 1990 und 2000 stark ausgedehnt worden, von ca. 100'000 ha in den frühen 90er Jahren auf 1,4 Mha im Jahr 2000.

4.2.2 Sortenwahl

In Kanada und dem übrigen Ausland werden nahezu ausschließlich Canola-Sommerrapssorten angebaut. Raps (*Brassica napus*) und Rübsen (*Brassica rapa*) bilden 90% bzw. 10% der in Westkanada angebauten Canolabestände, während in Ostkanada nur *Brassica napus* angebaut wird. Der größte Teil des Bestandes ist transgen. Im Jahre 2001 waren bereits 80% des auf insgesamt 4 Mha kultivierten *Brassica-napus*-Bestandes herbizidresistent. 47% waren glyphosatresistent, 13% waren glufosinatresistent, und <1% waren bromoxynilresistent. 20% waren imidazolinonresistent und nicht transgen ([Warwick u.a. 2003](#)). In Australien gilt Raps inzwischen als eine wertvolle Frucht. Da manche Unkräuter, vor allem solche aus der Familie der Brassicaceen, besonders hartnäckig und durch Herbizide nur begrenzt in Schach zu halten sind, werden von den Farmern neben transgenen Canolarassen auch herbizidtolerante nicht transgene Varietäten eingesetzt trotz ihrer geringeren Ernte- und Ölerträge. In Deutschland findet man neben Null- und Doppelnullvarietäten auch konventionelle Rapssorten, die als Futterraps für Wiederkäuer und für die Biodieselproduktion, die den größten Teil der deutschen Rapsernte aufnimmt, verwendet werden können. Es sind mehrere transgene Rapslinien für den Anbau in Europa zugelassen. In Deutschland wird infolge prohibitiver gesetzlicher Regelungen kein transgener Raps kommerziell angebaut.

4.2.3 Aussaat, Kulturzeit und Ertrag

Winterraps wird in der Zeit vom 20. August bis zum 15. September ausgesät. Im Mai und Juni blüht der Raps leuchtend gelb und prägt damit inzwischen viele Kulturlandschaften mit. Sommerraps sät man möglichst in der Zeit zwischen Anfang bis Mitte März. Der Erfolg des Sommerrapsanbaus hängt entscheidend vom Aussattermin ab. Generell wird eine sehr frühe Aussaat angestrebt. Bei später Aussaat sind niedrige Erträge vorprogrammiert. Die Ursache dafür liegt im Langtagcharakter des Sommerrapses: Bei sehr früher Aussaat wird

unter den noch kürzeren Tageslängen die notwendige vegetative Pflanzenmasse als Voraussetzung für hohe Erträge gebildet, bevor mit zunehmender Tageslänge schließlich der Übergang zur Blütenbildung erfolgt. Der deutsche Rapsanbau brachte im Zeitraum 2008 - 2014 einen mittleren Ernteertrag von 3,83 t/ha (Tab. 15). Der mittlere Ölgehalt der Samen beträgt 43%.

4.2.4 Fruchtfolge

Raps ist nicht selbstverträglich. Eine Pause von mindestens 3, besser 4 Jahren nach dem letzten Anbau ist zweckmäßig. Dies bedeutet: Raps soll einen Anteil von 25% an der Ackerfläche eines Betriebes nicht überschreiten. Bei Anteilen von 33% Raps und mehr in der Fruchtfolge wurde vielfach eine starke Zunahme von Krankheiten und Schädlingen beobachtet. Unter diesen Umständen ist dann ein verstärkter Einsatz von

Pflanzenschutzmitteln notwendig. Die Einhaltung der Fruchtfolge ist auch deshalb zweckmäßig, weil Raps für viele Kulturpflanzen gute Vorfruchtbedingungen schafft.

Jahr	Anbaufläche (Mha)	Ertrag (Mt)	Hektarertrag (t/ha)
2008	1,37	5,15	3,7
2009	1,47	6,3	4,3
2010	1,46	5,69	3,9
2011	1,33	3,87	2,9
2012	1,3	4,82	3,7
2013	1,46	5,79	3,9
2014	1,4	6,2	4,2

Tab. 15. Rapsanbau 2008 - 2013 in Deutschland (Ufop, 2014).

4.3 Verwertung der Ernte

4.3.1 Stoffliche Verwertung

Schon in den alten Zivilisationen Asiens und des Mittelmeerraums wurde Raps kultiviert. In Indien wurde er nachweislich bereits 2000 v. Chr. verwendet. In Europa wurde er seit dem 13. Jh. angebaut, vorwiegend, um Öl für Lampen zu gewinnen. In Kanada wurde der Raps erstmals 1942 kommerziell eingesetzt, um Schmieröl zur Verwendung in Kriegsschiffen zu erzeugen. In Australien begann die kommerzielle Nutzung 1969. Essbares Öl wurde erstmals in Kanada

1956 aus Rapssamen extrahiert. Das nach der Ölextraktion zurückbleibende Canolasaatmehl wird anstelle von Sojaschrot als eiweißreicher Futterzusatz für Tierfutter verwendet. Canola und Doppelnulrraps werden jetzt vorwiegend wegen ihrer Samen angebaut, die 35% bis >45% eines qualitativ hochwertigen Speiseöls liefern. Von allen pflanzlichen Speiseölen hat Canolaöl den niedrigsten Gehalt an gesättigten Fettsäuren. Es dient

hauptsächlich zum Kochen, aber auch zur Herstellung von Margarine und ist Bestandteil vieler anderer Lebensmittel. Neben seiner Nutzung als Speiseöl und als Rohstoff für Speisefette wird Raps in Deutschland auch zur Herstellung technischer Produkte angebaut. Rapsöl wird vor allem für die Herstellung von Schmier- und Hydraulikölen verwendet, die vor allem dort eingesetzt werden können, wo ein großes Risiko vorhanden ist, dass Öl ins Oberflächen- oder Grundwasser gelangt. Ferner dient Rapsöl zu Herstellung von Reinigungsmitteln und Kosmetika.

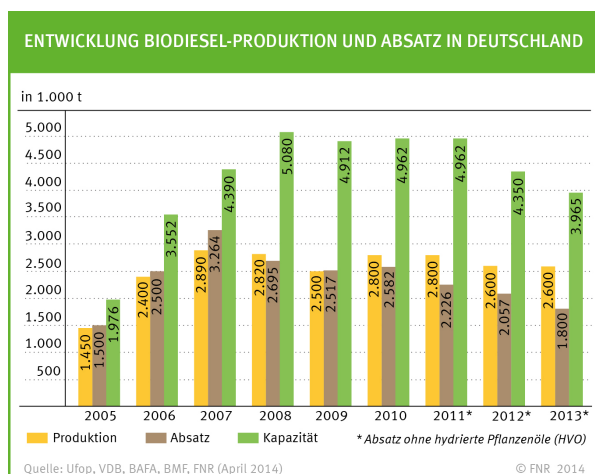


Abb. 54. Biodieselproduktion 2005 - 2013 (FNR, 2014).

4.3.2 Energieraps

Deutschland ist weltweit der größte Biodieselproduzent, wobei die Produktion überwiegend auf Rapsöl basiert. Rund zwei Drittel der Rapsernte werden zur Produktion von Rapsöldimethylester (RME) eingesetzt. Infolge massiver staatlicher Förderung sind Rapsanbau und Produktionskapazität für Biodiesel in Deutschland stark ausgeweitet worden. Im Jahr 1998 wurden rund 50'000 Tonnen Biodiesel produziert. 2007 waren es bereits 2,9 Millionen Tonnen.

Seitdem ging die Produktion zurück und lag 2013 noch bei 2,6 Mt, wovon 1,8 Mt im Inland abgesetzt wurden. Biodiesel, der nicht der Erfüllung der gesetzlichen Beimischungsquote dient, wurde seit 2010 mit zunächst

24,50 ct/l progressiv besteuert und kommt am Markt kaum noch vor. Seit 2013 liegt die Energiesteuer auf Biodiesel bei 45 ct/L ([FNR, 2014](#)).

Die Gesamtkapazität der Biodieselanlagen in Deutschland war im Zeitraum von 2007 - 2013 im Mittel zu nur 58% ausgelastet (Abb. 54). Den deutschen Biodieselproduzenten droht damit dasselbe Schicksal wie vielen amerikanischen Bioethanolherstellern. Bei steigenden Produktionskosten und stagnierender oder fallender staatlicher Förderung geraten sie unter die Rentabilitätsschwelle und müssen ihre Betriebe schließen. Die Ausweitung der Produktion von Treibstoffen aus Speiseölen und anderen Nahrungsmitteln wirft grundsätzliche Fragen auf wie die nach der energetischen Rentabilität, möglichen Konflikten mit der Nahrungsmittelproduktion, der Umweltfreundlichkeit und der wirtschaftlichen Rentabilität ([1.3.2](#)).

4.4 Biotechrap

Die Gattung *Brassica* gehört zum Wirtsbereich von *Agrobacterium tumefaciens*. *Brassica napus* lässt sich gut mit *Agrobacterium* transformieren, weshalb die gegenwärtig zugelassenen transgenen Biotechrapssorten ausnahmslos durch agrolistische Transformation entstanden sind. Andere Transformationstechniken wie die beim Mais übliche Biolistik spielen beim Raps kaum eine Rolle. Die folgenden aus der GM Crop Database ([Cera, 2015](#)) stammenden Beispiele sind gut geeignet, den beim Biotechrap erreichten Stand marktreifer Entwicklungen zu verdeutlichen. Am weitesten verbreitet sind gegenwärtig glufosinattolerante LibertyLink™- und glyphosattolerante Roundup-Ready®-Varietäten. In Kanada, dem weltweit größten Biotechrapproduzenten, waren im Jahre 2005 82% der Canolaflächen transgen. 48% der Flächen entfielen auf Roundup-Ready®-Sorten, 34% auf LibertyLink™-Sorten, 14% auf durch chemische Mutagenese entstandene herbizidresistente Sorten, und 4% auf gewöhnlichen Canolaraps ([Leonhard 2006](#)).

4.4.1 Herbizidtolerante Sorten

4.4.1.1 MON-00073-7 (GT73, RT73)

Zulassung und Anbau

Der von Monsanto entwickelte Biotechrap MON-00073-7 (Synonyme GT73, RT73) toleriert die Glyphosat als Wirkstoff enthaltenden Totalherbizide (Roundup® u. a.). Er ist zur Verwertung in Lebensmitteln (Öl) und als Tierfutter (Samenmehl) entwickelt worden. Er wurde erstmals 1995 in Kanada und später in mehreren weiteren Ländern zum Anbau und zur Vermarktung zugelassen.

Molekulargenetik

Die Glyphosattoleranz des MON-00073-7-Canolarapses entsteht durch die Gegenwart von zwei Transgenen, welche durch agrolistische Transformation in die konventionelle Rapslinie GT73 übertragen wurden. Das erste der beiden Gene kodiert eine modifizierte Form des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS) des Agrobakterienstamms CP4 (CP4-EPSPS). Es besteht aus einer einzigen Peptidkette mit 455 Aminosäuren. Auch Pflanzen bilden EPSPS, welche sie zur Synthese aromatischer Aminosäuren benötigen. Glyphosat wird selektiv von der pflanzeigenen EPSPS gebunden, wodurch das Enzym inaktiviert wird. Die modifizierte Form der CP4-EPSPS hat dagegen eine stark verringerte Affinität für Glyphosat und macht die Pflanze dadurch gegenüber Glyphosat unempfindlich. Das zweite Gen stammt ursprünglich aus dem Bakterium *Ochrobactrum anthropi* und kodiert Glyphosatoxidase. Die Sequenz des Gens wurde modifiziert, um die Affinität des Enzyms für Glyphosat zu steigern. Die modifizierte Form heißt *goxv247*. Das Gen kodiert ein Polypeptid mit einer Länge von 431 Aminosäuren. Von der Wildform unterscheidet sich das modifizierte Enzym durch den Austausch von drei Aminosäuren. Glyphosatoxidase (GOX) beschleunigt den normalen Abbau von Glyphosat zu Aminomethylphosphonsäure (AMPA) und Glyoxylat. AMPA wird durch verschiedene Mikroorganismen abgebaut. Glyoxylat ist ein normaler Metabolit des pflanzlichen Lipidstoffwechsels. Es wird in dem danach benannten Glyoxylsäurezyklus umgesetzt, der es keimenden Samen ermöglicht, im Endosperm des Samens vorrätige Fette in Saccharose und Kohlenhydrate umzuwandeln. Das Zusammenwirken der beiden Enzyme schützt Biotechrapspflanzen vor der Schädigung durch glyphosathaltige Herbizide. Um eine möglichst hohe Expression des CP4-EPSPS-Enzyms in der Pflanze zu erreichen, wurde sein Gen mit den Steuersignalen des FIMV35S-Promoters verknüpft. Letzterer ist dem bekannteren 35S-Promoter des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV35S) sehr ähnlich. Er ist mindestens so wirksam und bewirkt wie dieser die Expression nachgeschalteter Gene in den meisten Pflanzengewebe. Die Peptidkette der pflanzeigenen EPSPS beginnt mit einem Transitpeptid, einer Signalsequenz, welche die Proteintransportmechanismen der Pflanzenzelle veranlasst, das Enzym nach seiner Synthese im Zellplasma in die Chloroplasten zu transportieren, wo es einen Schritt bei der Synthese aromatischer Aminosäuren katalysiert. Die Chloroplasten sind der Wirkungsort des Glyphosats. Aus diesem Grunde wurde die CP4-EPSPS-Gensequenz mit einer Chloroplastentransit-Peptidsequenz verknüpft. Sie stammt aus einem Gen für ein Chloroplastenprotein der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Ein ähnliches Signalpeptid verknüpfte man mit dem Glyphosatoxidasegen *goxv247*. Auch dieses Gen wird von einem FIMV-35S-Promoter geregelt.

Im Genom des 00073-7-Biotechrapes findet man keine funktionsfähigen Vektorsequenzen. Es enthält auch keine Antibiotikaresistenzgene. Molekularbiologische Analysen zeigen, dass die Transformanten jeweils eine einzige vollständige Kopie der beiden Transgene enthalten. Ebenso zeigen sie, dass die Präproteine nach ihrer Synthese an den Ribosomen des Zellplasmas in die Chloroplasten importiert und dort durch enzymatische

Abspaltung der Signalsequenzen korrekt zu den funktionsfähigen Enzymen verarbeitet werden. Das Rapsgenom besteht aus zwei Komponenten, dem Genom der Stoppelrübe (*Brassica rapa*) und dem des Kohls (*Brassica oleracea*). Die beiden Transgene von MON 00073-7 residieren im *Brassica-rapa*-Teil des Rapsgenoms. Sie sind stabil ins Genom integriert und werden über mehrere Generationen vererbt, ohne ihre Funktionsfähigkeit zu verlieren. Die beiden Genprodukte, CP4-EPSPS und GOX, findet man sowohl in den Blättern als auch in den Samen. Ihre Konzentration ist gering. Bei CP4-EPSPS liegt sie zwischen 18 und 34 µg/g Frischgewicht und bei GOX zwischen 108 und 193 µg/g Frischgewicht.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die agronomischen Merkmale von MON 00073-7 unterscheiden sich von denen seiner konventionellen Vorläufer nicht. Der einzige fassbare Unterschied zum konventionellen Raps besteht in der Expression der beiden rekombinierten Enzymproteine CP4-EPSPS und GOX und der damit verbundenen Glyphosatresistenz. Quantitative Analysen der Samenzusammensetzung ergaben keinerlei Unterschiede zum normalen Raps. Insbesondere gilt dies auch für die Höchstkonzentrationen von Erucasäure (2%) und Glucosinolaten (30 µmol/g im ölfreien Mehl), welche für Canola festgelegt wurden. Das Öl ist daher von derselben Qualität wie gewöhnliches Canolaöl.

4.4.1.2 ACS-BN004-7 x ACS-BN001-4

Zulassung

Diese von Aventis CropScience entwickelte hybride Produktionslinie entstand durch Kreuzung der männlich sterilen Biotechrapslinie MS1 mit der Restorerlinie RF1. Sie ist glufosinatresistent und fertil. Entwickelt wurde sie zur Verwendung des Öls in Lebensmitteln und des Samenmehls in Tierfutter. Seit 1995 wurde sie in Kanada, den USA und mehreren weiteren Ländern zum Anbau und zur Vermarktung zugelassen.

Molekulargenetik

Die MS1- und RF1-Biotechrapslinien erhielt man beide durch agrolistische Transformation der Sorte Dakkar. Sie bilden ein transgenes männliches Sterilitätssystem. Die Linie MS1 ist transgen, männlich steril und glufosinatresistent. Die männliche Sterilität wird durch das *barnase*-Transgen hervorgerufen. Es stammt aus *Bacillus amyloliquefaciens*, einem verbreiteten Bodenbakterium, welches vielfach zur Produktion industriell genutzter Enzyme dient. Das *barnase*-Gen kodiert eine Ribonuklease (Barnase). In der MS1-Biotechrapslinie wird das Gen nur während der Pollenentwicklung im Tapetum der Pollensäcke exprimiert, was zum Stillstand der Pollenentwicklung und zur Bildung von Blüten mit sterilen Staubblättern führt. RF1 ist transgen, glufosinatresistent und Träger des *barstar*-Restorergens. Auch *barstar* stammt aus *Bacillus amyloliquefaciens*. *barstar* kodiert den RNase-Inhibitor Barstar, welcher mit Barnase einen stabilen Proteinkomplex bildet und die RNase so zu inaktivieren vermag. In der RF1-Linie wird das Gen, da es wie *barnase* mit einem tapetumspezifischen Promoter gekoppelt ist, nur während der Pollenentwicklung im Tapetum der Pollensäcke exprimiert. Wenn nun die Blüten der männlich sterilen MS1-Linie von Pollen der RF1-Restorerlinie befruchtet werden, bilden die aus der Kreuzung hervorgehenden hybriden Rapspflanzen im Tapetum sowohl Barnase als auch Barstar. Die Pollenentwicklung läuft normal ab, und die Fertilität ist wiederhergestellt. Beide Biotechrapslinien tragen das *bar*-Gen, welches sie unempfindlich gegenüber dem Phosphinothricin enthaltenden Breitband-Nachauflaufherbizid Liberty® macht. Das aus dem verbreiteten Bodenpilz *Streptomyces hygroscopicus* isolierte *bar*-Gen kodiert eine Phosphinothricinacetyltransferase (PAT), welche das Phosphinothricin acetyliert, wobei seine Herbizidwirkung verloren geht. Die Herbizidresistenz dient in den beiden Canolalini zu, in der Gewebekultur transformierte Pflanzenzellen zu identifizieren und zu isolieren, um aus diesen dann transgene Pflanzen zu regenerieren. Außerdem ermöglicht sie die Selektion zu 100% reinen Hybridsaatguts im Feld.

Die T-DNA des Vektors bestand jeweils aus drei funktionell verschiedenen Segmenten: *barnase* (MS1) oder *barstar* (RF1), *bar* und einem Gen für Neomycinphosphotransferase (*nptii*). *barnase* von MS1 und *barstar* von RF1 verknüpfte man mit einem gewebespezifischen Promoter (PTA29) des Tabaks (*Nicotiana tabacum*). Er wird im Tabak nur in den Zellen des Tapetums und nur während der Pollenentwicklung exprimiert. Das gleiche Expressionsverhalten zeigt er auch im Raps. *bar* koppelte man an einen vorwiegend in grünen Pflanzengewebe aktiven Promoter. Am Genanfang trägt es die Signaltransportsequenz eines Chloroplastenproteins. Beide Sequenzabschnitte stammen ursprünglich aus *Arabidopsis thaliana*. Promoter und kodierende Sequenz von *nptii* sind Teil der T-DNA des Ti-Plasmids der Agrobakterien. Die *nptii*-Expression im Pflanzengewebe ermöglicht die

Selektion transformierter Pflanzenzellen, die das *barstar*- bzw. das *barnase*-Gen enthalten, auf kanamycinhaltigen Nährböden.

Molekularbiologische Analysen zeigen, dass die drei hintereinander liegenden Transgene unverändert an einer einzigen Stelle in den *Brassica-rapa*-Teil des Genoms eingebaut werden. Die Analyse der Insertionsstelle ergab keinerlei Hinweise darauf, dass durch die Insertion der fremden DNA ein natives Pflanzengen unterbrochen wird. MS1 und Rf1 sind mehrere Generationen von den ursprünglichen Transformanten entfernt. Der Vergleich der Genome und über mehrere Generationen durchgeführte Rückkreuzungen zeigen, dass die neuen Merkmale stabil sind und sich wie ein einzelner Locus nach den Mendelschen Regeln vererben. *bar* wird in Blättern und Blütenknospen exprimiert. *barnase* und *barstar* zeigen das aufgrund des tapetumspezifischen Promoters zu erwartende Expressionsverhalten. Die Expression von *nptii* ist schwach. In Pollen und frischem Honig ist keine Neomycinphosphotransferase nachweisbar.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die Canolalinien MS1, RF1 und die Hybriden der Kreuzung MS1 x RF1 sind zwischen 1991 und 1994 im Feld in Kanada getestet worden. Man fand keine Unterschiede zum Wildtyp in den agronomischen Eigenschaften. Erwartungsgemäß zeigen die Hybriden den Heterosiseffekt und lieferten einen höheren Samenertrag als die Elternlinien. Die Blüten der männlich sterilen MS1-Linie sind etwas kleiner, haben unentwickelte Antheren und können keinen fertilen Pollen produzieren. Die Nektarproduktion ist dagegen unverändert, und die Blüten werden von Insekten bestäubt.

4.4.2 Sorten mit Stoffwechselmodifikationen

4.4.2.1 23-18-17 und 23-198

Zulassung

Diese Sorten sind von der konventionellen Canolalinie 212/86 abgeleitet, in die ein Gen eingeführt wurde, welches aus dem Berglorbeer oder kalifornischen Lorbeer (*Umbellularia californica*), einem kleinen Baum oder Strauch der kalifornischen Küstenregion, stammt. Es kodiert ein Enzym, welches im Speichergewebe des reifenden Rapskorns gebildet wird und die Synthese zweier Fettsäuren, Laurinsäure und Myristinsäure, bewirkt, welche im normalen Raps nicht gebildet werden. Das aus den Samen dieser Linien gewonnene Öl hat einen Laurinsäuregehalt, der etwa dem von Palmkernöl entspricht.

Der erhöhte Laurinsäuregehalt des Öls ermöglicht die Verwendung anstelle von anderen Laurinsäureölen wie Kokosnuss- oder Palmkernöl in Produkten wie Glasuren und Füllungen von Konfekt, Margarine und Frittierölen. Laurinsäure verwendet man außerdem bei der Herstellung von Seifen und Kosmetika. Die Sorten sind in den USA und Kanada zum Anbau und zur Verwertung des Öls bzw. Samenmehls als Nahrungsmittel, Tierfutter und für industrielle Anwendungen zugelassen. Sie wurden über einige Jahre hinweg in den USA kommerziell angebaut. Das Öl wurde unter dem Namen Laurical als Ersatz für Palmkern- und Kokosöl in den Handel gebracht. Zwar hat es sich u. a. wegen des hohen Preises am Markt nicht durchsetzen können, die Sorten sind aber insofern interessant, als sie das erste Beispiel kommerziell genutzter Nutzpflanzen mit gentechnisch modifiziertem Lipidstoffwechsel bilden und in naher Zukunft zahlreiche weitere Biotechpflanzen mit vergleichbaren Stoffwechselmodifikationen zu erwarten sind.

Molekulargenetik

Die beiden Biotechraplinien 23-198 und 23-18-17 entstanden durch agrolistische Transformation der konventionellen Rapslinie 212/86. Die T-DNA enthielt das Gen für die 12:0-Acyl-Carrier-Protein-Thioesterase (TE) von *Umbellularia californica*. Das Acyl-Carrier-Protein (ACP) ist eine Komponente eines großen Enzymkomplexes des Lipidstoffwechsels. Er bewirkt die Synthese langkettiger Fettsäuren, die dann mit Glycerol zu Fetten verestert werden. Laurinsäure (12:0) und Myristinsäure (14:0) sind zwei Fettsäuren mit 12 bzw. 14 C-Atomen und 0 (Null) Doppelbindungen. Das TE-Gen wird unter der Kontrolle eines samenspezifischen pflanzlichen Promoters exprimiert. Die T-DNA trug außerdem ein vom CaMV35S-Promoter geregeltes Neomycinphosphotransferase-Gen. Es verleiht Kanamycinresistenz und wurde als Selektionsmarker benutzt, um transformierte Pflanzen zu isolieren, welche das *Umbellularia*-TE-Gen trugen. Es wurden keine weiteren funktionsfähigen DNA-Elemente ins Rapsgenom eingebaut.

Nach molekularbiologischen Analysen enthalten die primären Transformanten ca. 15 Kopien des TE-Gens an fünf verschiedenen genetischen Loci. Die Linien 23-198 und 23-18-17 sind mehrere Generationen von den

ursprünglichen Transformanten entfernt. Der Vergleich der ersten mit der dritten Generation zeigte, dass die Gene stabil integriert sind und normal vererbt werden. Wegen der hohen Kopienzahl wird vermutet, dass die transgenen Loci in der Nachkommenschaft gemäß den Mendelschen Regeln aufspalten (segregieren) und die Nachkommen, was die Kopienzahl angeht, heterogen sind. Das *Umbellularia*-TE-Gen ist mit einem samenspezifischen Promoter verknüpft und wird nur im Samen während der Entwicklung des Embryos exprimiert. Das Gen kodiert ein 382 Aminosäuren langes Vorprodukt (Präprotein), welches in die Plastiden transportiert wird, wo ein 60 Aminosäuren langes Transitpeptid abgespalten wird, wodurch das reife TE-Enzym entsteht. Das Protein ist im mittleren Reifungsstadium der Samen (Abb. 55) experimentell nachweisbar. Es macht nur 0,015% des gesamten Samenproteins aus. Im trockenen Samen und in allen anderen Pflanzenteilen findet man keine nachweisbaren Mengen des Enzymproteins. Das NPTII-Gen ist mit einem konstitutiven Promoter verknüpft, und seine Expression lässt sich im Samen und anderen Geweben des transgenen Rapses in geringen Mengen nachweisen.



Abb. 55. Samen der Laurinsäure bildenden Rapslinien 23-18-17 und 23-198 (A. R. Krahn, University of Saskatchewan).

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die vor der Zulassung notwendigen Feldversuche wurden in den USA (1991 - 1992) und Kanada (1993 - 1995) durchgeführt. Die Glucosinolat- und Erucasäurekonzentrationen liegen unterhalb der zulässigen Grenzwerte. Menge und Qualität des Samenproteins sind gleich wie beim konventionellen Raps. Das Fettsäureprofil der Samen ist jedoch verschieden. Die Expression von TE im Speichergewebe des Rapssamens hat zur Folge, dass Laurinsäure und in geringerem Umfang Myristinsäure synthetisiert wird. Die Samen der ursprünglichen Transformanten zeigten eine breite Variation des Laurinsäuregehalts und schwankende TE-Aktivitäten.

Durch nichtdestruktive Analyse des Fettsäureprofils der Samen, Selektion und Züchtung entwickelte man aus den primären Transformanten marktfähige Lauricatlinien. Bei diesen kann der Laurinsäuregehalt bis zu 50% betragen, während er bei konventionellem Canola weniger als 0,1% beträgt. Niedriger als beim Standardcanolaraps ist dagegen der Gehalt an anderen Fettsäuren wie Ölsäure, Linolensäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachidonsäure und Gadoleinsäure. Nur die Behensäure ist leicht erhöht. Tab. 16 zeigt eine typische Analyse. Der gesamte Lipidgehalt des Samens ist trotz dieser Verschiebungen unverändert, und dies gilt auch für die ernährungsphysiologische Qualität des Öls. Bei der Zusammensetzung des Samenmehls gibt es zwischen Lauricatrapssamen und konventionellem Raps so gut wie keine Unterschiede. Protein-, Energie- und Fasergehalt sind gleich. Die TE-Expression und das andersartige Fettsäureprofil im Rapssamen sind somit die einzigen bekannten Merkmale, in denen sich dieser Biotechrapssamen vom konventionellen Canola unterscheidet.

4.4.3 Weitere Beispiele

Neben den drei beschriebenen Biotechrapssorten gibt es zahlreiche weitere. [CERA](#) enthielt 2015 15 Einträge für *Brassica napus* (Argentinischer Raps, Raps) und zwei von *Brassica rapa* (Polnischer Raps, Stoppelrübe). Tab. 17 zeigt eine Auswahl. Die häufigsten transgenen Merkmale sind Herbizidresistenz und männliche Sterilität.

Fettsäure	Anteil (%)
Laurinsäure	38
Ölsäure	31
Linolsäure	11
Linolensäure	7
Myristinsäure	4
Palmitinsäure	3
andere	6

Tab. 16. Typische Zusammensetzung des Samenöls von Lauricalraps (A. R. Krahn).

Sorte	Jahr	Hersteller	Verfahren	Transgene	Eigenschaften
45A37	1996	Pioneer High Breed	chem. Mutagenese	-	Ölsäuregehalt erhöht, Linolensäuregehalt erniedrigt
OXY-235	1997	Aventis	Agrolistik	<i>bxn</i>	Oxyniltoleranz
HCN10	1995	Bayer/Aventis	Agrolistik	<i>pat</i>	Glufosinattoleranz
MS8xRF3	1996	Bayer/Aventis	Agrolistik	<i>bar, barnase, barstar</i>	Glufosinattoleranz, männl. Sterilität
PHY36	1997	Aventis	Agrolistik	<i>bar, barnase, barstar</i>	Glufosinattoleranz, männl. Sterilität

Tab 17. Zum kommerziellen Anbau zugelassene Biotechrapvarietäten. Die Gene in Spalte 5 kodieren folgende Proteine:

bxn: Nitrilase (*Klebsiella pneumoniae*)

pat: Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (*Streptomyces viridochromogenes*)

barnase: Barnase (*Bacillus amyloliquefaciens*)

barstar: Barstar (*Bacillus amyloliquefaciens*)

Die Jahreszahlen in der zweiten Spalte beziehen sich auf das Jahr der erstmaligen Zulassung, bei Hybriden auf das Zulassungsjahr des zuerst zugelassenen Kreuzungspartners ([Cera, 2015](#)).

4.5 Prototypen

4.5.1 Aluminiumtoleranz

4.5.1.1 Toxizität von Aluminium

Aluminium (Al) ist für viele Pflanzen ein stark toxisches Element. Unter sauren Bedingungen werden im Boden aus Aluminiumsilikaten dreiwertige Aluminiumionen (Al^{3+}) freigesetzt. Da saure Ackerböden 30 - 40% der ackerbaulich nutzbaren Landfläche der Erde ausmachen, stellt dies eine schwerwiegende Beeinträchtigung des Anbaus vieler Kulturpflanzen dar. Die Erzeugung Al-toleranter Getreide und anderer Kulturpflanzen ist folglich ein wichtiges Züchtungsziel, das jedoch mit den Methoden der konventionellen Pflanzenzüchtung bisher nicht erreicht werden konnte, obwohl mehrere Kulturpflanzen eine genetisch bedingte Variabilität hinsichtlich der Fähigkeit, Al zu tolerieren, zeigen. Die Beobachtung, dass die Überexpression bestimmter Enzyme des Citronensäurezyklus, eines zentralen Stoffwechselwegs der zellulären Energiegewinnung, in Modellpflanzen die Al-Toleranz verbessern kann, hat vermuten lassen, dass durch Modifizierung des Citratstoffwechsels aluminiumtolerante Kulturpflanzen gezüchtet werden können ([de la Fuente u. a. 1997](#)).

4.5.1.2 Ursachen der Aluminiumtoleranz

Al hemmt das Wachstum der Wurzelspitzen. Die Hemmung der Wurzelverlängerung ist eines der sichtbarsten Symptome der Al-Schädigung. Die Wurzeln natürlicherweise Al-toleranter Pflanzen scheiden in Gegenwart von Al^{3+} -Ionen häufig Citrat und andere organische Säuren aus, denen die Fähigkeit gemeinsam ist, mit Al^{3+} -Ionen Komplexe (Chelate) zu bilden. Defektmutanten der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), denen bestimmte, am Umsatz der Citronensäure beteiligte Enzyme fehlen, unterscheiden sich in der Al-Toleranz. Sie ist anscheinend mit dem Citratpegel in der Hefezelle korreliert. Die Überexpression einer Citratsynthase der Hefemitochondrien bewirkt eine 2-3fache Erhöhung des Citratspiegels und erhöhte Al-Toleranz. Wegen dieser Beobachtungen sieht man den Mechanismus der Al-Entgiftung in der vermehrten Bildung und Ausscheidung von Citrat und anderen organischen Säuren durch die Wurzeln und der nachfolgenden Komplexbildung der in der Bodenlösung vorhandenen Al-Ionen.

4.5.1.3 Aluminiumtoleranter Raps

Transformiert man Raps, der gegen saure Böden und Al empfindlich ist, agrolistisch mit dem Gen der mitochondrialen Citratsynthase von *Arabidopsis thaliana*, so beobachtet man in den Transgenikern eine verstärkte Expression dieses Enzyms und eine gesteigerte Al-Toleranz ([Anoop u. a. 2003](#)). Wenn die Wurzeln der Pflanzen in eine Nährlösung gebracht werden, die Al-Ionen enthält (150 $\mu\text{mol/l}$), erhöht sich der Citratspiegel im Spross. Gleichzeitig verdoppelt sich die Citratausscheidung des Wurzelsystems. Merkwürdigerweise ist die Citratkonzentration in der Wurzel nicht erhöht, obwohl das Transgen mit dem konstitutiven CaMV35S-Promoter verknüpft ist. Gegenüber dem Wildtyp zeigen die Transgeniker ein um 20 - 25% besseres Wachstum in Gegenwart von Al-Ionen (50 - 200 $\mu\text{mol/l}$). Davon abgesehen unterscheiden sie sich vom Wildtyp nicht.

Insgesamt weisen zahlreiche Beobachtungen darauf hin, dass zwischen der Ausscheidung organischer Säuren durch die Wurzel und der Al-Toleranz ein Zusammenhang besteht. Die Überexpression der Citratsynthase ist nicht nur beim Raps sondern auch bei anderen Pflanzen (Tabak, Papaya, *Arabidopsis*) mit erhöhten Citratspiegeln und verbesserter Al-Toleranz korreliert. Ob der erhöhte Citratspiegel Ursache oder lediglich Begleiterscheinung der Al-Toleranz ist, konnte bisher nicht zweifelsfrei geklärt werden. Citrat ist ein Schlüsselmetabolit zentraler Stoffwechselwege wie der Zellatmung, der Aminosäuresynthese und der Fettsäuresynthese. Deshalb muss damit gerechnet werden, dass gentechnische Eingriffe in den Citratstoffwechsel nicht ohne Einfluss auf Vitalität und agronomische Leistungsmerkmale einer Pflanze sind und mehrere Enzyme manipuliert werden müssen, damit man anbaufähigen Al-toleranten Biotechrapss bekommt. Der Weg dorthin ist also wohl noch weit.

4.5.2 Salztoleranz

4.5.2.1 Bodenversalzung und Pflanzenwachstum

Die landwirtschaftliche Produktivität ist auf versalzten Böden stark beeinträchtigt. Weltweit sind mehr als 60 Mha Ackerland von der Bodenversalzung betroffen. Der schädliche Einfluss von Salz auf Pflanzen hat im wesentlichen zwei Ursachen: Hohe Natriumionenkonzentrationen in der Bodenlösung verursachen ein Wasserdefizit, weil sie den Wurzeln die Wasseraufnahme erschweren. Außerdem bewirken sie eine Erhöhung der

intrazellulären Na^+ -Konzentration, die hemmend auf viele Enzyme wirkt und dadurch den Zellstoffwechsel beeinträchtigt. Wildpflanzen, die an salinen Standorten wachsen können (Halophyten) haben zwar hohe intrazelluläre Na^+ -Konzentrationen; die Enzyme dieser Pflanzen sind aber empfindlich gegen Salz, was vermuten lässt, dass Halophyten fähig sind, Na^+ -Ionen vom Cytoplasma fernzuhalten.

Pflanzen können drei Strategien verfolgen, um im Zellplasma eine niedrige Na^+ -Konzentration aufrechtzuerhalten: den Natriumausschluss, die Natriumexkretion und die Natriumkompartimentierung. Der Natriumausschluss wird dadurch verwirklicht, dass die äußere Membran der Pflanzenzelle, das Plasmalemma, den Eintritt von Na^+ -Ionen bis zu einem gewissen Grad zu verhindern vermag. Die Natriumexkretion wird durch ins Plasmalemma eingebettete Ionenpumpen bewirkt. Das sind Proteine oder Proteinkomplexe, welche Na^+ -Ionen im Austausch gegen H^+ -Ionen aus der Zelle herausbefördern und deshalb als Na^+/H^+ -Antiporter bezeichnet werden. Die Natriumkompartimentierung ermöglichen funktionell gleichwertige Transporter im Tonoplasten, der inneren Plasmamembran, welche das Cytoplasma ausdifferenzierter Pflanzenzellen gegen den zentralen Saft Raum, die Vakuole, abgrenzt. Sie sind geometrisch so im Tonoplasten orientiert, dass Na^+ -Ionen aus dem Cytoplasma entfernt und in der Vakuole angereichert werden.

Die Antiporter werden wie andere Membranproteine an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und anschließend in definierter Orientierung in das Plasmalemma bzw. den Tonoplasten eingebaut. Die Transportleistung hängt von der Aktivität des Transporters ab, jedoch auch von ihrer Dichte, d. h. der Zahl der pro Membranflächeneinheit eingebauten Transportermoleküle. Die Überexpression eines vakuolären Na^+/H^+ -Transporters sollte deshalb die Na^+ -Akkumulierung in der Vakuole steigern können. Dadurch sollten einerseits die toxischen Na^+ -Effekte im Zellplasma vermieden werden, und andererseits sollte sich die Saugkraft der Zellen erhöhen, so dass sie in der Lage sind, trotz hoher Salzkonzentration im Boden Wasser aufzunehmen.

4.5.2.2 Salztoleranter Raps

AtNHX1 ist ein gut charakterisierter vakuolärer Na^+/H^+ -Antiporter von *Arabidopsis thaliana*. Wird er in Modellpflanzen oder im Raps überexprimiert, so zeigt sich, dass die transgenen Pflanzen noch bei einer Natriumchloridkonzentration von 200 mM wachsen können (Zhang u. a. 2001). Das Wachstum von gewöhnlichem Raps ist bei dieser Konzentration schwer beeinträchtigt, und dies gilt auch für die meisten anderen Ackerpflanzen.

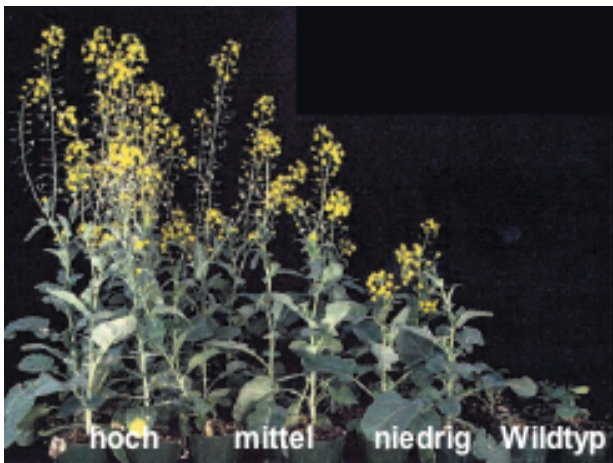


Abb. 56. Wachstum von gewöhnlichem Raps und transgenem Raps, der den AtNHX1-Antiporter stark, mäßig und schwach exprimiert. Die Pflanzen sind 10 Wochen alt und wachsen in Gegenwart von 200 mM NaCl. (Zhang u. a., 2001. PNAS 98: 2832); nachbearbeitet.

Je stärker der AtNHX1-Antiporter in den Rapspflanzen exprimiert wird, desto höher ist ihre Salztoleranz. Durch Analyse isolierter Fragmente der Tonoplastenmembran kann man auch nachweisen, dass der Transporter in die Tonoplastenmembran eingebaut wird.

Phänotypisch unterscheiden sich bei hoher Salzkonzentration wachsende transgene Rapspflanzen (Abb. 56) vom Wildtyp kaum. Sie blühen wie der Wildtyp bei niedriger Salzkonzentration und setzen ebensoviele Samen an wie dieser. Bei hoher Salinität findet man in Blättern und Wurzeln der Transgeniker bis um den Faktor 70 höhere Na^+ -Konzentrationen, während der K^+ -Gehalt um ca. 80% geringer ist. Die Konzentration der Aminosäure Prolin, der eine Schutzfunktion gegenüber Salzstress zugeschrieben wird, ist auf das 5fache erhöht. Die Analyse der Zusammensetzung der im Blatt und in der Wurzel vorhandenen Lipide und Fettsäuren zeigt nur geringe Abweichungen. Im Samen findet man weder bei den Ionenkonzentrationen noch bei der Zusammensetzung des Samenöls Abweichungen vom Wildtyp.

Ursprünglich ging man davon aus, dass Stressmerkmale wie die Salztoleranz einer komplexen genetischen Steuerung unterliegen und deshalb nur verbessert werden können, wenn es gelingen sollte, die Expression mehrerer oder vieler Gene synergistisch zu verändern. Im Gegensatz zu dieser Vorstellung zeigt der den AtNHX1-Antiporter überexprimierende Raps und andere nach dem gleichen Prinzip entwickelte salztolerante transgene Pflanzen, dass die gezielte, aus dem Verständnis der molekularen Genfunktion abgeleitete Übertragung eines

einzigsten neuen Merkmals die Salztoleranz einer Kulturpflanze ohne erkennbare Beeinträchtigung anderer Eigenschaften signifikant verbessern kann. Da dies nur gentechnisch möglich ist, liefern salztolerante transgene Pflanzen auch überzeugende Beispiele für das Entwicklungspotential einer modernen, gentechnischen Verfahren einschließenden Pflanzenzüchtung.

4.5.3 Steigerung des Ölgehalts der Rapssamen

Rapsöl besteht wie andere Pflanzenöle aus Triacylglyceriden, in denen drei Fettsäurereste gemeinsam durch Esterbindungen an einen Glycerinrest gebunden sind. Die in pflanzlichen Fetten und Ölen hauptsächlich vorkommenden Fettsäuren, Palmitinsäure (C₁₆) und Stearinsäure (C₁₈), werden in den Plastiden synthetisiert. Die Fettsäuresynthese ist ein komplexer aus vielen Einzelschritten bestehender Prozess. Er beginnt mit Acetylcoenzym A. Der an Coenzym A gebundene Essigsäurerest wird in einer zyklischen Reaktionsfolge schrittweise um jeweils 2 C-Atome verlängert. Deshalb haben die in der Natur vorkommenden Fettsäuren meist eine gerade Zahl von C-Atomen. Die in den Plastiden gebildeten primären Fettsäuren werden durch die Plastidenhülle ins Cytoplasma exportiert. Dort können aus den primären Fettsäuren durch Kettenverlängerung (Elongation), Einführung von einer oder mehreren Doppelbindungen (Desaturierung) und andere Reaktionen abgeleitete Fettsäuren synthetisiert werden, welche durch Veresterung mit Glycerin und anderen Alkoholen eine große Zahl von Lipiden liefern. Die Veresterung findet am endoplasmatischen Reticulum statt und besteht aus drei aufeinander folgenden Acylierungsreaktionen. Sie beginnt mit der durch Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase katalysierten Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat, welches aus der Glykolyse stammt, zu Glycerin-3-Phosphat. Es folgt der erste Acylierungsschritt am ersten C-Atom des Glycerin-3-Phosphatmoleküls durch Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) zu Lysophosphatidsäure. In der zweiten Acylierungsreaktion wird diese durch Lysophosphatidsäure-Acyltransferase (LPAT) zu Phosphatidsäure acyliert, welche dann durch Phosphatidatphosphatase zu Diacylglycerin dephosphoryliert wird. Die dritte und letzte Acylierung bewirkt die Umwandlung von Diacylglycerin durch Diacylglycerin-Acyltransferase (DGAT) ins fertige Triacylglycerin (Abb. 57). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Triacylglycerinsynthese durch Überexpression der Dehydrogenase (GPDH) und der drei Acyltransferasen gesteigert werden kann. Im transgenen Tabak (*Nicotiana benthamiana*) als Modellsystem bewirkt die vom samenspezifischen Napinpromoter des Raps gesteuerte Überexpression von LPAT aus Hefe eine Steigerung des Samenölgehalts um 6-8%, die Überexpression der Rapsgene von GPDH und GPAT mit demselben Promoter eine solche von ca. 4%. Die samenspezifische Koexpression aller vier Gene im Raps steigert den Ölgehalt um 15 - 23%. Dies gilt auch dann, wenn Rapslinien transformiert werden, welche bereits einen hohen Ölgehalt besitzen. Die Steigerung des Ölgehalts entspricht etwa der Summe der von den 4 Genen bewirkten Ertragssteigerungen, die sich ergibt, wenn diese einzeln im Tabak überexprimiert werden. Durch simultane Überexpression von Genen der Triacylglycerinsynthese lässt sich demnach eine wesentlich höhere Steigerung des Ölertrags ermöglichen, als dies mit monotransgenen Sorten möglich ist ([Liu u. a., 2014](#)).

4.5.4 Stoffwechselumbau beim Braunen Senf

4.5.4.1 Steigerung des Vitamin-E-Gehalts des Samenöls

Struktur der Tocopherole

Vitamin E ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von acht fettlöslichen Substanzen. Vier der acht bekannten Vitamin-E-Formen werden Tocopherole genannt. Die anderen bisher bekannten vier Formen von Vitamin E werden Tocotrienole genannt. Alle Tocopherole sind amphipathische, aus einem polaren (hydrophilen) und einem unpolaren (hydrophoben) Teil bestehende Moleküle. Die Grundstruktur bildet ein polarer an Position 6 hydroxylierter Chromanring, der an Position 2 bei den Tocopherolen mit einer unpolaren gesättigten Seitenkette und bei den Tocotrienolen mit einer unpolaren ungesättigten Seitenkette verknüpft ist, welche je eine Doppelbindung am 3., 7. und 11. C-Atom trägt. Die Seitenkette ist ein Derivat des Phytols, eines langkettigen aliphatischen Alkohols, der auch ein Strukturbestandteil des Chlorophyllmoleküls ist. Abhängig von der Methylierung des Chromanrings werden Tocopherole und Tocotrienole in eine α -, β -, γ - oder δ -Form unterteilt.

Vorkommen und Synthese

Vitamin E ist Bestandteil der Membranen tierischer und pflanzlicher Zellen, wird jedoch nur von photosynthetisch aktiven Organismen wie Pflanzen und Cyanobakterien gebildet. Gewöhnlich ist das α -Tocopherol die dominierende Form in Blättern, während γ -Tocopherol und Tocotrienole in hohen Mengen in

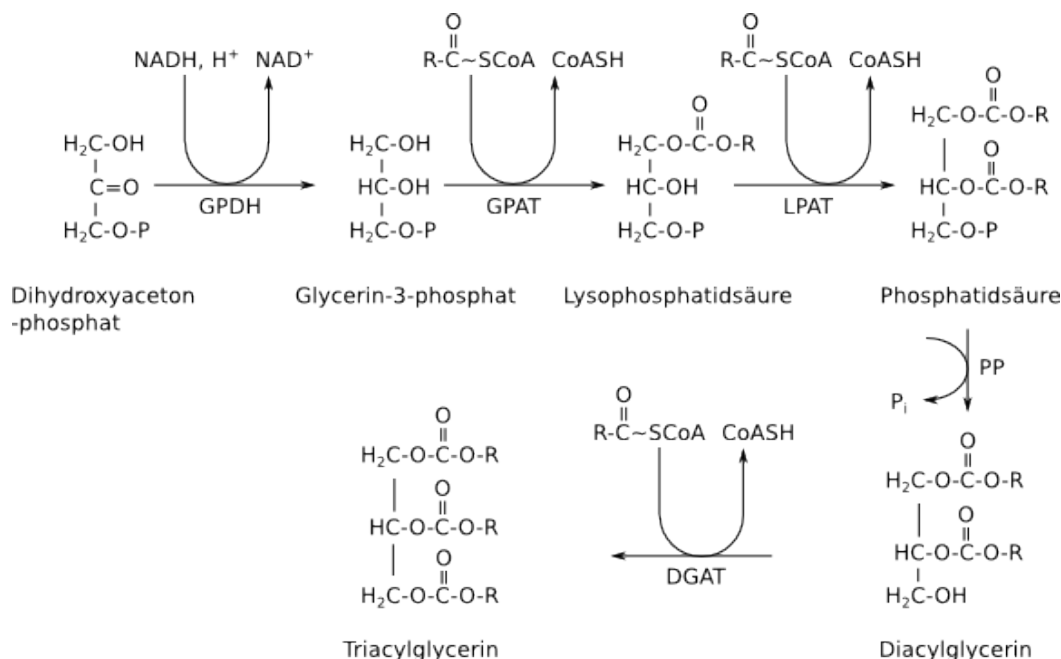


Abb. 57. Grundreaktionen der Synthese pflanzlicher Öle und Fette. Aus der Glykolyse stammendes Dihydroxyacetonphosphat wird durch Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase zu Glycerin-3-Phosphat reduziert, welches in drei konsekutiven Acylierungsschritten in Triglyceride umgewandelt wird. Die Fettsäuren werden in den Plastiden synthetisiert, durch die Plastidenhülle ins Cytoplasma transportiert und dort über eine Thioesterbindung an Coenzym A gebunden. Von diesem werden sie in drei aufeinanderfolgenden Acylierungsreaktionen auf ein Glycerinmolekül übertragen. Durch Überexpression von GPDH und den 3 Acyltransferasen im transgenen Raps kann der Ölgehalt der Samen gesteigert werden.

GPDH Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase, GPAT Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase, LPAT Lysophosphatidsäure-Acyltransferase, DGAT Diacylglycerin-Acetyltransferase, PP Phosphatidatphosphatase.

Samen vieler Pflanzen angereichert werden. Wichtige Vitamin-E-Lieferanten für den Menschen sind insbesondere Keimöle und kaltgepresste Speiseöle, ferner Milch, Eier, aber auch einige Gemüsesorten.

Den Syntheseweg der Tocopherole kennt man seit über 30 Jahren. Der aromatische Kopf der Tocopherole wird im Zellplasma aus aromatischen Aminosäuren gebildet, der hydrophobe Schwanz in den Plastiden. Das gesamte Tocopherolmolekül entsteht in den Plastiden durch Kondensation der aromatischen Homogentisinsäure mit dem hydrophoben Phytyldiphosphat. Der letzte Syntheseschritt ist die Methylierung von γ - und δ -Tocopherolen zu α -Tocopherol durch Tocopherolmethyltransferase (TMT), die S-Adenosylmethionin als Methylgruppenüberträger benutzt. In photosynthetischen Geweben ist α -Tocopherol das hauptsächliche Endprodukt. In nicht photosynthetischen Geweben und Samen können Zwischenprodukte, γ -, δ - und β -Tocopherole, in erheblichen Mengen angehäuft werden.

Biologische Funktionen der Tocopherole in Pflanzen

Eine der wichtigsten Vitamin-E-Funktionen ist die eines lipidlöslichen Antioxidans, das in der Lage ist, mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden, Lipoproteinen und Depotfett vor einer Zerstörung durch Oxidation (Lipidperoxidation) zu schützen. Der aromatische Chromanring des Tocopherols reagiert mit Sauerstoffradikalen und ist in der Lage, diese abzufangen. Vermutlich benötigt die Pflanze diesen Schutz, um reaktive Sauerstoffformen zu neutralisieren, die in der Photosynthese gebildet werden. Tocopherole sind ferner Funktionselemente mehrerer Signaltransduktionswege und wirken mit an der Regelung der Transkription.

Wirkungen bei Tieren und dem Menschen

Tocopherole wirken auch im tierischen und menschlichen Körper als Antioxidantien, die reaktive Sauerstoffformen neutralisieren können. Obwohl alle Tocopherole starke Antioxidantien sind, hat α -Tocopherol die höchste Vitamin-E-Aktivität. Dies liegt daran, dass das α -Tocopherol-Transferprotein der Leber, welches für den Transport von Vitamin E im Blutkreislauf verantwortlich ist, α -Tocopherol wesentlich besser bindet als β -, γ - und δ -Tocopherole und Tocotrienole. Viele medizinische Studien weisen darauf hin, dass α -Tocopherol Herz-Kreislaufkrankungen, Entzündungsreaktionen und Krebs vorbeugen oder den Verlauf dieser Krankheiten günstig beeinflussen kann. Vitamin E soll den Alterungsprozess verlangsamen, die roten Blutkörperchen schützen, die Durchblutung verbessern und Gefäßablagerungen verhindern helfen. Allerdings ist die tägliche Aufnahme therapeutisch wirksamer Vitamin-E-Mengen ohne den Verbrauch großer Mengen mit dem Vitamin angereicherter Lebensmittel schwierig. Seit einigen Jahren versucht man deshalb, die pflanzliche Tocopherolsynthese zu optimieren und Pflanzen mit hohem α -Tocopherolgehalt zu züchten. Vor allem Ölpflanzen wie Raps und Soja kommen dafür in Betracht, da diese die bedeutendsten Vitamin-E-Lieferanten sind.

Die Hauptnahrungsquelle von Vitamin E sind pflanzliche Samenöle. Diese haben einen sehr geringen α -Tocopherolgehalt, enthalten aber relativ viel γ -Tocopherol, welches der unmittelbare biochemische Vorläufer von α -Tocopherol ist. Dies weist darauf hin, dass vor allem der letzte Syntheseschritt, die durch γ -Tocopherol-Methyltransferase (γ -TMT) katalysierte Umwandlung von γ -Tocopherol in α -Tocopherol, die Geschwindigkeit der α -Tocopherolsynthese bestimmt. Die Überexpression dieses Enzyms sollte demnach eine Steigerung des α -Tocopherolgehalts auf Kosten von γ -Tocopherol bewirken. Transformationsversuche an *Arabidopsis thaliana*, der Sojabohne und dem Braunen Senf konnten dies bestätigen.

Umwandlung von γ -in α -Tocopherol

Der Braune Senf (*Brassica juncea*) ist eine mit dem Raps eng verwandte Ölfrucht des indischen Subkontinents, die auf mehr als 6 Mha angebaut wird. Senföl ist dort das meistverwendete Kochöl. Nicht transformierte *Brassica-juncea*-Pflanzen enthalten ca. 570 ng Gesamttocopherol pro mg Samenmasse. Die Hauptform ist γ -Tocopherol (ca. 86%). α -Tocopherol macht nur ca. 10% des Tocopherolpools aus. Transgene *Brassica-juncea*-Pflanzen, die das γ -TMT Gen von *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des CaMV35S-Promoters überexprimieren, enthalten etwa gleich viel Gesamttocopherol wie der Wildtyp. Der α -Tocopherolanteil ist jedoch auf bis zu 62% erhöht, was einer rund 6-fachen Steigerung entspricht. Die Steigerung ist gut mit der Expression des Transgens korreliert. Morphologisch und physiologisch unterscheidet sich der transgene Senf nach bisherigen Untersuchungen nicht von der Normalform (Yusuf & Sarin, 2007). Wahrscheinlich wird die weitere Entwicklung schon bald zu transgenen Canolasorten mit modifiziertem Tocopherolgehalt führen, da Raps und Brauner Senf eng verwandt sind und Raps global gesehen die größere wirtschaftliche Bedeutung hat.

4.5.4.2 Erweiterung der Fettsäuresynthese im Samen

Essentielle Fettsäuren und Fettsäuresynthese

Essentielle Fettsäuren wie Arachidonsäure (20 C-Atome, 4 Doppelbindungen), Eikosapentaensäure (20 C-Atome, 5 Doppelbindungen), Dokosapentaensäure (22 C-Atome, 5 Doppelbindungen) und Dokosahexaensäure (22 C-Atome, 6 Doppelbindungen) können vom menschlichen Körper nicht synthetisiert und müssen deshalb mit der Nahrung aufgenommen werden. Tierversuche zeigen, dass der Mangel an diesen Fettsäuren während der frühen Gehirnentwicklung zu bleibenden Schäden führen kann. Besonders gefährdet sind untergewichtige Frühgeborene schlecht ernährter Mütter. Das Gehirn besteht zu 60% aus Strukturlipiden, die regelmäßig Arachidonsäure und Dokosahexaensäure enthalten. Beide Säuren kommen in der Muttermilch vor. Die ausreichende Versorgung mit essentiellen Fettsäuren ist eine wichtige Voraussetzung zur Verhinderung permanenter prä- und neonataler Entwicklungsstörungen, da sich nur so die an molekularen Membranen reichen Gewebe des Gehirns, Nerven- und Gefäßsystems normal entwickeln können. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mehr als 19 C-Atomen findet man vor allem in tierischen Fetten. Die Produktion essentieller Fettsäuren in Pflanzen würde der Lebensmittelindustrie eine neue und kostengünstige Quelle dieser ernährungsphysiologisch wichtigen Nahrungsbestandteile erschließen.

Bildung mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren aus Linol- und Linolensäure

Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA) kommen weder im Rapsöl noch im Senföl vor. Die Samen von *Brassica juncea* enthalten aber endogene Linolsäure (18 C-Atome, 2

Doppelbindungen) und Linolensäure (18 C-Atome, 3 Doppelbindungen), welche in drei konsekutiven Schritten durch Desaturierung, Elongation und erneute Desaturierung in AA und EPA umgewandelt werden können. In das Genom von *Brassica juncea* müssen mindestens 3 Gene eingeführt werden, damit die Pflanze diese Schritte durchführen kann. Um die Ausbeuten zu verbessern und auch die Synthese von DHA zu erreichen, sind mehrere weitere Enzymgene erforderlich. [Wu u. a. \(2005\)](#) entwickelten hierzu eine Serie von Binärvektoren. Auf ihrer T-DNA tragen diese 3-9 an der Biosynthese langkettiger Fettsäuren beteiligte Enzymgene aus verschiedenen Organismen. Sechs der 9 Gene stammen aus Niederen Pilzen, eines aus einem Fisch, eines aus einem Moos und eines aus einer Höheren Pflanze. Alle Gene wurden mit dem Promoter des Rapsnapingens verknüpft, welches ein gleichnamiges Samenspeicherprotein von *Brassica napus* kodiert. Die mit dem komplexesten Konstrukt agrolistisch transformierten Senfpflanzen tragen 9 Transgene, die alle exprimiert werden. Ihr Samenöl enthält im Mittel 4% AA, 8% EPA und 0,2% DHA. Alle diese Fettsäuren liegen nahezu ausschließlich als Triacylglycerole vor. Im Wildtyp sind sie nicht nachweisbar. Wenn auch die Ausbeuten noch gering sind, so zeigen diese Experimente doch klar, dass es prinzipiell möglich sein muss, den pflanzlichen Lipidstoffwechsel so umzubauen, dass sich essentielle Fettsäuren in Ölpflanzen wirtschaftlich in großem Maßstab produzieren lassen. Auch methodisch gesehen stellt die Bildung essentieller Fettsäuren im transgenen Braunen Senf einen Fortschritt dar. Die gleichzeitige Übertragung von bis zu 9 Genen mit einem einzigen Vektor bedeutet eine drastische Verringerung des Transformationsaufwands. Gleichzeitig erleichtert sie die spätere Einkreuzung der neuen Merkmale in konventionelle Hochleistungssorten. Da die neuen Gene auf einem einzigen DNA-Segment unmittelbar hintereinander liegen, sollten sie in der Regel *en bloc* vererbt werden, so dass der neue Syntheseweg in den Kreuzungsnachkommen erhalten bleibt.

5 Soja

5.1 Biologie

5.1.1 Morphologie

Die zu den Bohnengewächsen (Familie *Fabaceae*) gehörende kultivierte Sojabohne (Abb. 58) ist eine einjährige (annuelle) krautige (nicht verholzende) Pflanze, die buschig aufrecht wächst und bis 1,5 m hoch werden kann. Am häufigsten sind aufrecht wachsende Sorten von 20 bis 80 cm Wuchshöhe. Die Stengel sind ziemlich dünn und mehr oder weniger stark verzweigt. Unter den verbreitet angebauten Sorten findet man 3 Wachstumstypen: determinat, halbdeterminat und indeterminat. Beim determinaten Wachstumstyp, dem die Mehrzahl der Sorten



Abb. 58. Sojapflanzen ([USDA, 2016](#)).

angehört, stellt der Vegetationspunkt, das Bildungsgewebe (Meristem) an den Sprossspitzen, das Wachstum ein, sobald ein Blütenstand (Racem) gebildet wird. Dies gilt sowohl für die Hauptachse als auch für die Seitenachsen des Sprosssystems. Bei undeterminaten Sorten setzt das Sproßsystem sein Wachstum während der gesamten Blühperiode fort. Der halbdeterminat Wachstumstyp nimmt eine Mittelstellung zwischen determinaten und undeterminaten Formen ein. Determinate Genotypen werden vorwiegend in den südlichen, indeterminate primär in nördlichen Regionen Nordamerikas angebaut. Keine Sojasorte ist winterhart und kann Dauerfrostbedingungen überleben.

Die Primärblätter der Sojapflanze sind ungeteilt, gegenständig und oval, die Sekundärblätter sind langgestielt und bestehen meist aus 3 unpaarig gefiederten, ganzrandigen Blättchen. Diese sind oval und 3 bis 10 cm lang sowie 2 bis 6 cm breit. Die Sekundärblätter sind zweizeilig (distich) am Stengel angeordnet. Bei dieser für viele

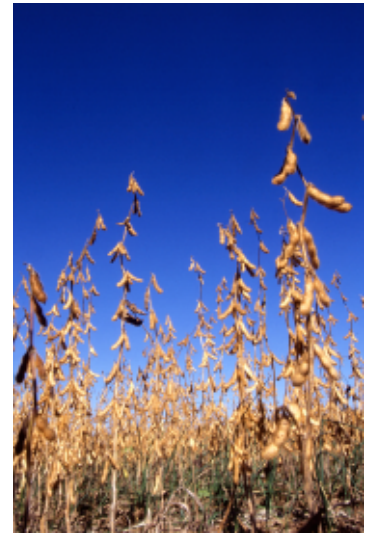


Abb. 59. Erntereifes Sojafeld ([USDA, 2016](#)).

Fabaceen charakteristischen Blattstellung steht an jedem Stengelknoten nur ein Blatt, wobei die Blätter zweier aufeinanderfolgender Knoten sich im Winkel von 180° gegenüberstehen. Gelegentlich findet man an einer Pflanze auch zusammengesetzte Blätter mit 4 oder mehr Einzelblättern. Die Blätter werden bereits während der Fruchtreifung abgeworfen (Abb. 59). Die Oberhaut (Epidermis) der meisten Kultivare ist fein behaart und trocken, aber es gibt auch Typen mit klebriger (glabröser), von Drüsenhaaren überzogener Oberfläche.

Das Wurzelsystem besteht aus einer bis 1,5 m tief gehenden Pfahlwurzel, von der ein seitliches (laterales), mit zahlreichen Knöllchen besetztes (noduliertes) Wurzelwerk gebildet wird. In den Wurzelknöllchen (Noduli) befinden sich dem Boden entstammende Bakterien, welche in Symbiose mit der Pflanze leben und die Fähigkeit besitzen, den Luftstickstoff zu binden und so ihre eigene Stickstoffversorgung und die ihrer Wirtspflanze zu verbessern. Innerhalb der Familie der Fabaceen sind fast alle Gattungen mit Knöllchen versehen. Die Wurzelknöllchen sind lokale Wucherungen des Rindengewebes. In den vergrößerten polyploiden Parenchymzellen überleben die prokaryontischen Symbionten als sogenannte Bakterioide in besonderen Vakuolen. Zunächst handelt es sich bei der Entstehung der Noduli um eine regelrechte Infektion der Wurzel durch verschiedene im Erdboden lebende Bakterien der Gattung *Rhizobium* oder *Bradyrhizobium*, die den für sie geeigneten Wirt erkennen. Die Bakterien dringen meist durch die Wurzelhaare in das Gewebe der Wurzelrinde ein, worauf deren Zellen sich zu teilen beginnen. Die Wirtszellen vergrößern und vermehren sich unter der Wirkung der Infektion stark. Ihre Kerne werden tetraploid. So entstehen die Wurzelknöllchen, deren innere Zellen dicht von den jetzt aus den Infektionsschläuchen austretenden Bakterien erfüllt sind. Die Infektion breitet sich nicht über die Knöllchen hinaus aus, da die Bakterien von einer pflanzeigenen Membran, der Peribakterioidmembran, umhüllt werden. Die Bakterien verändern bald ihre Gestalt in auffälliger Weise und werden zu Bakterioiden. Sie erhalten von der Pflanze wohl vor allem Kohlenhydrate und geben die Produkte

ihrer Stickstofffixierung überwiegend als Ammoniumionen, NH_4^+ , an diese ab. Das zur Reduktion des Luftstickstoffs erforderliche bakterielle Enzym, die Nitrogenase, kann bis 10% des löslichen Gesamtproteins der Bakterioide ausmachen. Der Wirt baut dann den reduzierten Stickstoff in artspezifische Verbindungen ein und transportiert die Produkte durch ein zu den Knöllchen führendes Leitbündel ab. Schließlich werden die Protoplasten der Knöllchenzellen und die meisten Bakterien aufgelöst und die molekularen Bestandteile von der Wurzel aufgenommen. Da in der Regel nach dem Absterben der Leguminosen am Ende der Vegetationsperiode immer noch mehr Bakterien in den Erdboden zurückgelangen als bei der Infektion ursprünglich eingedrungen waren, hat nicht nur die Höhere Pflanze Nutzen von diesem Zusammenleben.

Die Blüten (Abb. 60) stehen zu 3 bis 20 in blattachselbürtigen oder endständigen Trauben. Sie sind klein, zweiseitig symmetrisch (schmetterlingsförmig) und zwittrig. Der röhrenförmige Kelch besteht aus 5 miteinander verwachsenen Kelchblättern. Die Blütenkrone ist 5-blättrig. Das nach oben weisende, vergrößerte Kronblatt ist die Fahne. Die beiden seitlichen sind die Flügel. Die beiden vorderen miteinander verwachsenen bilden das Schiffchen. Neun der 10 Staubblätter sind zu einer oben offenen, den Fruchtknoten umgebenden Röhre verwachsen. Das 10. hintere ragt frei nach oben. Einen Tag vor der Bestäubung verlängern sich die Staubblätter, wobei die aufgerichteten Antheren einen Ring um das Stigma bilden.

Die Sojabohne ist ein sich durch Samen vermehrender Selbstbefruchter. Für die Hybridenzüchtung benutzt man die künstliche Fremdbestäubung. Die Narben der Sojabluten sind ca. 24 h vor der Blütenöffnung (Anthese) befruchtungsfähig und bleiben dann weitere 48 h rezeptiv. Die Antheren der Staubblätter bestäuben noch in der

Knospe die Narbe derselben Blüte. Kreuzbefruchtungen haben gewöhnlich einen Anteil von weniger als 1%. Die Blühperiode erstreckt sich meist über 3 bis 4 Wochen.



Abb. 60. Blühende Sojapflanze (Transgen).

Nur 20 bis 80 Prozent der Blüten setzen Früchte an. Die Frucht (Abb. 61) ist eine klappig aufspringende in einsamige Glieder zerfallende gerade oder leicht gekrümmte Hülse. Sie ist 2-7 cm lang und bei der Reife strohgelb, grau oder schwarz. Sie besteht aus den beiden Hälften eines einzigen Fruchtblatts, die durch eine Rücken- und eine Bauchnaht verbunden sind.

Eine Pflanze kann bis zu 400 Hülsen bilden, wobei man an einem Stengelknoten 2 - 20 Hülsen findet. In jeder findet man 2-5 Samen von brauner, grüner oder schwarzvioletter Farbe. Die Form ist je nach Sorte kugelig, ei- oder nierenförmig, flach oder gewölbt. Das Tausendkorngewicht reicht von 50 bis 450 g. Reife, trockene Samen enthalten



Abb. 61. Aufgesprungene Sojahülse mit Samen (Wikipedia).

5,0 bis 9,4% Wasser, 29,6 bis 50,3% Eiweiß, 13,5 bis 24,2% Fett, 14,0 bis 33,9% Kohlenhydrate, 2,6 bis 6,3% Rohfaser und 3,3 bis 6,4% Asche. Weder Hülse noch Samen haben morphologische Eigenschaften, welche die Verbreitung durch Tiere begünstigen könnten.

5.1.2 Stoffwechsel

Biologische Stickstofffixierung

Die auffallendste Besonderheit im Stoffwechsel der Fabaceen ist ihre Fähigkeit, durch die Symbiose mit den in den Wurzelknöllchen lebenden Rhizobien und Bradyrhizobien den reichen Vorrat der Atmosphäre an molekularem Stickstoff nutzen zu können. Die biologische N_2 -Fixierung (63 - 116 Mt/Jahr) übertrifft die industrielle (30 Mt/Jahr) mengenmäßig noch weit ([Strasburger u. a., 1991](#)). Die Bakterien benötigen dafür ein besonderes Enzymsystem, die Nitrogenase. Sie kommt auch bei Cyanobakterien und Actinomyceten

(Strahlenpilzen) vor, die ebenfalls Luftstickstoff assimilieren können. Die Nitrogenase der Rhizobien ist ein Eisen- und Molybdänionen enthaltender Proteinkomplex aus zwei verschiedenen molekularen Untereinheiten. Durch Sauerstoff werden beide Untereinheiten schnell irreversibel inaktiviert. Die Nitrogenasereaktion benötigt chemische Energie und Elektronen, welche von dem zellulären Energieüberträger Adenosintriphosphat (ATP) bzw. dem Ferredoxin, einem eisenhaltigen Protein, geliefert werden.

Von den symbiontischen Rhizobien in den Wurzelknöllchen der Leguminosen wird das durch die Nitrogenase gebildete NH_4^+ an das Cytoplasma der Knöllchenzellen abgegeben und dort von Glutaminsynthetase in Glutamin eingebaut. Mithilfe von Glutamatsynthase kann dann Glutamat, von Asparaginsynthase Asparagin entstehen. Der Abtransport aus den Wurzelknöllchen erfolgt in den Wasserleitungsbahnen, dem Xylem, mit dem Transpirationsstrom, wobei Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure und Alanin die quantitativ wichtigsten Transportamino-säuren sind. Die Fixierungsrate beträgt dabei 30 - 100 mg N pro g Frischgewicht der Knöllchen pro Tag, d. h. ein Knöllchen kann täglich etwa 3 - 10 mal seinen eigenen Stickstoffgehalt umsetzen.

Das Stickstoffmolekül ist ein chemisch sehr stabiles Gebilde, und es bedarf eines erheblichen Energieaufwands, um ein Stickstoffmolekül zu Ammoniak (NH_3) bzw. Ammonium (NH_4^+) zu reduzieren. Man nimmt an, dass in den Bakterioiden unter physiologischen Bedingungen hierzu 25 - 35 Moleküle ATP erforderlich sind. Die zur ATP-Synthese erforderliche Energie stammt aus der Veratmung von Kohlenhydraten, die von der Pflanze den Bakterioiden der Noduli zur Verfügung gestellt werden müssen. Pro mg reduziertem Stickstoff werden in den Wurzelknöllchen 5 - 20 mg Kohlenhydrate verbraucht.

Die bakterielle Nitrogenase ist sehr sauerstoffempfindlich. In Gegenwart von Sauerstoff werden ihre beiden Untereinheiten rasch irreversibel inaktiviert. In den Wurzelknöllchen ergibt sich so die paradoxe Situation, dass die Bakterioide eine hohe Sauerstoffzufuhr brauchen, um die für die Nitrogenasereaktion benötigten ATP-Mengen synthetisieren zu können, andererseits aber die Konzentration an im Cytoplasma gelösten Sauerstoff extrem niedrig gehalten werden muss, damit die Inaktivierung der Nitrogenase verhindert wird. Die Zellen des Wurzelparenchyms, welche die Noduli bilden und die Bakterioide beherbergen, besitzen eigene Sauerstoffüberträger, die Leguminosen-Hämoglobine (Leghämoglobine). Diese werden in so großen Mengen synthetisiert, dass die Wurzelknöllchen im Längsschnitt blutrot erscheinen. Die Leghämoglobine erfüllen eine ähnliche Funktion wie die Myoglobine in den Muskeln der Wirbeltiere, welche als intrazelluläre Sauerstoffspeicher dienen und die Sauerstoffversorgung der Mitochondrien erleichtern, in denen die Zellatmung abläuft. Leghämoglobine können eine 20fach höhere Affinität zum Sauerstoff haben als Myoglobin. Aufgrund des Sauerstoffbindungsverhaltens der Leghämoglobine ist die Konzentration des im Cytoplasma der Nodularzellen gelösten Sauerstoffs mit 7 - 11 nmol/l sehr gering. Wenn man mit der RNA-Interferenztechnik ([2.5.1](#)) die Gene der Leghämoglobine von *Lotus japonicus* (japanischer Hornklee), einer wichtigen Modellpflanze der Leguminosenforschung, stilllegt, hört die Stickstofffixierung auf. Die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen erschweren die Versorgung der Bakterioide mit dem für die Atmung nötigen Sauerstoff, was diese dadurch kompensieren, dass sie eine symbiosespezifische Cytochromoxidase mit einer sehr hohen Sauerstoffaffinität bilden. Cytochromoxidase katalysiert den letzten biochemischen Schritt der Zellatmung, indem sie aus einem Sauerstoffmolekül, 4 Protonen und 4 Elektronen zwei Wassermoleküle bildet.

Betrachtet man einen Längsschnitt durch ein Wurzelknöllchen, so lassen sich verschiedene Stadien der Symbioseentwicklung beobachten, angefangen von der Initiierung der Symbiose in der Nähe des wachsenden Meristems durch die Reifungszone in der Mitte bis zu einer Alterungszone in der Nähe der Wurzel. Die bakteriellen Stickstofffixierungsgene werden nach einem geordneten sequentiellen Muster als Antwort auf die allmählich abnehmende Konzentration an freiem Sauerstoff induziert. Parallel dazu gibt es eine differentielle Expression der Leghämoglobine in den Parenchymzellen der Noduli. Dabei haben die Leghämoglobine, die in der Bildungszone exprimiert werden, eine geringere Affinität zum Sauerstoff als die der Reifungszone. Morphologische und biochemische Differenzierung der beiden Symbiosepartner sind offenbar eng miteinander verzahnt und bilden während der Induktion der symbiontischen Stickstofffixierung einen koordiniert ablaufenden komplexen Prozess.

Theoretisch wäre es denkbar, die Gene für die Stickstofffixierung von Bakterien bzw. Leguminosen auf andere Kulturpflanzen, z. B. Getreidearten, zu übertragen und diese dadurch von der Stickstoffdüngung unabhängig zu machen. Dies hätte eine außerordentliche wirtschaftliche Bedeutung, wird sich aber in der überschaubaren Zukunft kaum realisieren lassen. Zu komplex sind die symbiontischen Wechselwirkungen zwischen den

Rhizobien und ihren Wirtspflanzen und die mit der Nodulation einhergehenden morphologischen und biochemischen Differenzierungsprozesse.

5.1.3 Systematik, Phylogenie und Domestizierung

Die Sojabohne (*Glycine max* L.) gehört zur Klasse *Dicotyledoneae* (zweikeimblättrige Bedecktsamer), der Ordnung *Fabales* (Bohnenartige), der Familie *Fabaceae* (Hülsenfrüchtler), und der Unterfamilie *Faboideae* (Schmetterlingsblütler). Innerhalb dieser gehört sie gemeinsam mit der Gartenbohne (*Phaseolus*) zur Tribus (Obergattung) *Phaseoleae* und der Gattung *Glycine*. Die Sojabohne ist nur in Kultur bekannt. Der tetraploide ($2n = 40$) Chromosomensatz entstand durch Verdoppelung des Chromosomensatzes (Diploidisierung) einer diploiden Ausgangsform, die 10 Chromosomenpaare besaß. Eng verwandt mit der Sojabohne sind *Glycine soja* und *Glycine gracilis*. *Glycine soja* ist eine wilde Sojaart, die man an Wegen, Hecken, Feldrändern und Uferböschungen in vielen Ländern Asiens, nicht aber in Nordamerika, findet. Zytologische, morphologische und molekulare Evidenzen lassen vermuten, dass *Glycine soja* der Urahn der Sojabohne ist. *Glycine gracilis* gilt als unkrautige oder halbwilde Form von *Glycine max*. Ihre phänotypischen Merkmale liegen zwischen denen von *Glycine max* und *Glycine soja*. *Glycine gracilis* mag eine Zwischenform bei der Artbildung von *Glycine max* aus *Glycine soja* sein, vielleicht aber auch eine Hybride zwischen den beiden Arten.

Die Heimat der Sojabohne ist Nord- und Zentralchina. Sie gehört zu den ältesten Ackerpflanzen. Die ersten Berichte stammen bereits aus der vorchristlichen Zeit und sind vermutlich um 2800 v. Chr. geschrieben worden. Die Domestizierung begann zwischen dem 11. und 17. Jahrhundert v. Chr. in der östlichen Hälfte Chinas. Die Verbreitung über China und Japan hinaus fand erst sehr spät statt. Für Europa entdeckt wurde die Pflanze von Engelbert Kaempfer, der sie nach seiner Japan-Reise 1691/92 erstmals beschrieb. Aus dem Jahre 1737 gibt es erste Belege, dass die Sojabohne in Holland in botanischen Gärten gezogen wurde, 1739 auch in Frankreich. Ab 1840 gab es erste Anfänge, die Sojabohne als Ackerfrucht anzubauen. Der Durchbruch gelang Friedrich Haberlandt 1873 auf der Weltausstellung in Wien. In den USA wurde sie ab Beginn des 20. Jahrhunderts großflächig angebaut. Dort ist sie im Laufe der weiteren Domestizierung zur wichtigsten Ölpflanze geworden. In Europa wurde und wird sie nur im Süden und Südosten in nennenswerten Mengen angebaut (Italien, Rumänien, Länder des ehemaligen Jugoslawien, Frankreich, Ungarn, Bulgarien, Spanien).

5.2 Sojaproduktion

5.2.1 Ansprüche an Klima und Boden

Die Sojabohne (Abb. 62) ist eine quantitative Kurztagpflanze. Als solche kann sie zwar im Dauerlicht zur Blüte kommen, blüht aber schneller im Kurztag. In der natürlichen Umgebung geschieht dies dann, wenn die Tage im Sommer kürzer werden und dabei eine kritische Tageslänge unterschritten wird. In ihrem Ursprungsgebiet ermöglicht diese Anpassung des Blühverhaltens an die Tageslänge der Pflanze, rechtzeitig vor dem Winter zum



Abb. 62. Sojafeld (Transgen).

Blühen und Fruchten überzugehen, um die Wintertrockenheit als Samen zu überstehen. Es sind standortgerechte Formen sowohl für den tropischen Kurztag als auch die längeren Tage der gemäßigten Zonen gezüchtet worden. Dadurch wurde es möglich, den Anbau auszudehnen. Sojakultivare werden nach ihrem Blühverhalten und der Eignung für den Anbau in bestimmten Zonen klassifiziert, die von Osten nach Westen verlaufen und durch geographische Breite und Tageslänge charakterisiert sind. In Nordamerika kennt man 13 Reifungsgruppen MG 000, MG00, MG0, MG I, MG II...MG X (MG: maturity group), die von MG 000 im Norden (45° nördlicher Breite) bis zu MG X in Äquatornähe reichen. In jeder Gruppe gibt es früh-, mittel- oder spätreife Sorten.

Wenn die Bodentemperatur 10 °C erreicht, reifen Sojasamen unter günstigen Bedingungen innerhalb von 5-7 Tagen. Als Luftstickstoffsammler bevorzugen die Fabaceen trockene N-arme bzw. kalkreiche Böden und treten so

vor allem in den eurasischen Steppen und Halbwüsten auf. Sojabohnen liefern auf sauren Böden keinen guten Ertrag, so dass hier oft eine Kalkung des Bodens notwendig wird. In neuen Anbaugebieten ist eine Inokulation mit *Bradyrhizobium japonicum* notwendig, um die Nodulierung des Wurzelwerks zu verbessern. Bei optimalen Bodenverhältnissen und guter Nodulierung des Wurzelsystems benötigen Sojakulturen keinen oder nur sehr wenig Stickstoffdünger. Auf ihre Fähigkeit, den Boden zu verbessern, hat bereits der griechische Philosoph und Naturforscher Theophrast (4. Jahrh. v. Chr.) hingewiesen. Oft werden Sojabohnen in Rotation mit Mais, Getreide und anderen Bohnen angebaut.

5.2.2 Anbau

Soja wird kommerziell in mehr als 35 Ländern kultiviert. Soja bevorzugt warmes Klima und neutrale lockere Böden mit regelmäßiger Wasserversorgung. Die wichtigsten Anbaugebiete sind Nord- und Südamerika sowie China. Die USA, China, Nord- und Südkorea, Argentinien und Brasilien sind die Hauptproduzenten (Tab. 18). Die bedeutendsten Importländer sind Japan, die Niederlande und Deutschland. 35% der weltweiten Soja-Anbaufläche liegen in den USA, und 35% der Produktion stammen aus den Vereinigten Staaten, insbesondere aus Illinois und Iowa. Mehr als ein Drittel der US-Produktion wird exportiert, und Sojaöl ist in der US-amerikanischen Lebensmittelproduktion das verbreitetste Pflanzenöl.

Bei der Sojabohne ist die Verdrängung konventioneller Sorten durch leistungsfähigere Biotechsorten am weitesten fortgeschritten. Während 1996, zwei Jahre nach der erstmaligen Zulassung, glyphosatolerante Sojabohnen noch auf weniger als 5% der amerikanischen Sojaflächen angebaut wurden, war deren Flächenanteil in der Saison 2000 bereits auf 54% gestiegen. In den USA, dem größten Sojaproduzenten, waren bereits 2006 28 Mha (92%) der auf insgesamt 30,3 Mha angebauten Sojakulturen transgen. Ähnlich verlief die Entwicklung bei den anderen großen Sojaproduzenten. Inzwischen ist die globale Sojaproduktion (84,5 Mha) zu 79% transgen: USA 29,3 Mha / 93%, Argentinien 20,8 Mha / 100%, Brasilien 26,9 Mha / 92% ([GMO Compass, 2015](#)).

Einer der Gründe für die rasche Akzeptanz der glyphosatresistenten Sorten ist die drastische Vereinfachung der Unkrautbekämpfung. Da die Glyphosatherbizide recht wirksam gegenüber der großen Mehrzahl der ein- und mehrjährigen Gräser und Unkräuter sind, können Farmer beim Anbau glyphosatoleranter Sojabohnen sowohl die Zahl der verwendeten Herbizidwirkstoffe als auch die der notwendigen Feldeinsätze stark reduzieren und so

Rang	Land	Menge (Mt)
1	Vereinigte Staaten	89,483
2	Brasilien	81,724
3	Argentinien	49,306
4	China	11,950
5	Indien	11,948
6	Paraguay	9,086
7	Kanada	5,198
8	Bolivien	2,347
9	Uruguay	3,200
10	Russland	1,636
Welt		256,318
Tab. 18. Die weltweit größten Sojaproduzenten (FAOSTAT, 2016).		

die Kosten der Unkrautbekämpfung senken. Die Verringerung des Herbizideinsatzes und die Substituierung umweltgefährdender Herbizide durch das relativ ungiftige und leicht abbaubare Glyphosat entlastet die Umwelt. In Kombination mit dem Anbau glyphosatresistenter Sorten ermöglicht sie es den Farmern zudem, Methoden des integrierten, bedarfsgerechten Unkrautmanagements einzusetzen, die bei der konventionellen chemischen Unkrautbekämpfung nicht möglich sind.

Man schätzt die Einkommenszuwächse, welche die Sojabauern durch den Anbau von Biotechsoja in der Dekade von 1996 bis 2005 erzielen konnten, auf ca. 14,4 Milliarden US \$. Zwei Drittel der insgesamt 301 Mha, die 2006 mit den vier wichtigsten Biotechpflanzen Mais, Baumwolle, Raps und Soja weltweit bebaut wurden, entfallen nicht auf landwirtschaftliche Großbetriebe in den Industrieländern, sondern auf Millionen von Kleinbauern in den Entwicklungsländern, wo die Ressourcen knapper und die Erträge geringer sind und wo die Notwendigkeit zur Steigerung der Agrarproduktion am dringendsten ist (James, 2015).

Seit 1997 bauen auch Landwirte in Süddeutschland in der Region um Freiburg konventionelle Sojabohnen an. Mittlerweile werden 1000 Tonnen Sojabohnen auf ca. 1000 Hektar Anbaufläche produziert, das entspricht 0,0005 % der Weltproduktion. Aufgrund der EU-Agrarsubventionen für andere Ölpflanzen ist die Sojaproduktion in der EU marginal.

5.2.3 Verwertung der Ernte

Sojabohnen werden nahezu ausschließlich wegen ihrer Samen angebaut, die 30 - 50% Eiweiß, 25% Kohlenhydrate und 15 - 20% Öl, davon ca. 50% Linolsäure (C18:2) enthalten. Die Sojabohne hat vielfältige Verwendungen in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Sie ist einer der wichtigsten Lieferanten von Speiseölen und Proteinen für den Menschen und seine Nutztiere. Ihr Hauptwert liegt in ihrem hohen Gehalt an Eiweiß und an Öl, wobei letzterer für Bohnen ungewöhnlich ist. Bei einem Großteil der Weltproduktion wird zuerst das Öl extrahiert, die Restmasse (Sojaextraktionsschrot oder Sojakuchen) wird als Futtermittel genutzt, findet aber auch als Fleischersatz und Milchersatz Verwendung in der vegetarischen Küche. Zur direkten menschlichen Ernährung dienen die frischen, grünen Hülsen oder verschiedene Eiweißprodukte, deren bekannteste Tofu und Sojasauce sind. Daneben gibt es weitere Zubereitungen. Bei dem im Deutschen fälschlich als „Sojasprossen“ bezeichneten Nahrungsmittel handelt es sich um Keime der Mungbohne.

Die Sojabohne ist reich an sogenannten Phytoöstrogenen. Deren Hauptvertreter, die Isoflavone Genistein und Daidzein, sind Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsarbeiten und wurden mit den niedrigen Inzidenzraten hormonabhängiger Erkrankungen wie Brustkrebs und Dickdarmkarzinom in ostasiatischen Ländern in Verbindung gebracht, wo Soja in viel höheren Mengen konsumiert wird als in Westeuropa und den USA. Auch bezüglich des geringeren Auftretens von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* in diesen Ländern wird eine Verbindung mit dem täglichen Phytoöstrogenkonsum diskutiert, so dass sich Sojaisoflavonprodukte in jüngerer Vergangenheit immer größerer Beliebtheit erfreuen. Ob diese Produkte ihre Versprechen halten können, bleibt abzuwarten.

Der nicht von der Lebens- und Futtermittelindustrie verwertete Teil der Sojaernte dient unter anderem der Produktion von Lacken, Farben, Kleb- und Schaumstoffen, Desinfektionsmitteln, Seifen und Detergentien. Vor allem in den USA wird wegen der für eine Nahrungspflanze relativ günstigen Energiebilanz ein immer größerer

Teil der Sojaproduktion zur Herstellung von Sojadiesel eingesetzt. Zur Energie- und Ökobilanz der Sojadieselproduktion findet man im Überblick ([1.3.3](#)) Einzelheiten.

5.3 Biotechsoja

5.3.1 Herbizidresistente Sorten

In den Jahren 1994 - 1996 begann in den Vereinigten Staaten der Anbau gegen die Totalherbizide Glyphosat und Glufosinat resistenter Biotechsojasorten. Die übrigen großen Sojaproduzenten folgten bald diesem Beispiel. Es wurde ein Verdrängungsprozess in Gang gesetzt, der bewirkt hat, dass die konventionellen Sorten auf dem Weltmarkt heute kaum noch eine Rolle spielen. Biotechsoja wurde 2013 in 11 Ländern kommerziell angebaut. Der weltweite Flächenanteil transgener Sorten lag bei 66,7 Mha, 79% der Sojaanbauflächen. Das wichtigste transgene Merkmal ist Resistenz gegen Glyphosat oder Glufosinat als Wirkstoff enthaltende Totalherbizide. Von den 13 gegenwärtig ([Cera, 2015](#)) zugelassenen Sojakultivaren sind 10 monotransgen, 2 sind ditransgen und eine ist eine durch konventionelle Züchtung erhaltene Sorte mit niedrigem Linolensäuregehalt des Samenöls (Tab. 19).

Sorte	Hersteller	Merkmal	Funktionsgen
GTS40-3-2	Monsanto	Glyphosattoleranz	<i>cp4-epsps</i>
MON-89788			
MON87701		Insektenresistenz	<i>cry1Ac</i>
MON87701xMON8 9788		Glyphosattoleranz und Insektenresistenz	<i>cp4-epsps, cry1Ac</i>
DP356043	DuPont Pioneer	Glyphosat- und Imidazolinontoleranz	<i>gat4601, gm-hra</i>
A2704-12	Bayer Crop Science	Glufosinattoleranz	<i>pat</i>
A5547-127			
W62, W98			
GU262			
BPS-CV127-9	BASF	Imidazolinontoleranz	<i>csr1-2</i>
DP-305423	DuPont Pioneer	erhöhter Ölsäuregehalt	<i>gm-fad2-1</i>
G94-1	DuPont Canada		
OT96-15	Agriculture & Agrifood Canada	erniedrigter Linolensäuregehalt	-

Tab. 19. Zum kommerziellen Anbau zugelassene Biotechsojavarietäten ([CERA, 2015](#)). Die Gene der letzten Spalte kodieren die folgenden Proteine (Ursprungsorganismus in Klammern):

cp4-epsps: 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (*Agrobacterium tumefaciens*)

cry1Ac: Cry1Ac-Toxin (*Bacillus thuringiensis*)

gat4601: Glyphosat-N-Acetyltransferase (*Bacillus licheniformis*)

gm-hra: Acetolactatsynthases (*Glycine max*)

pat: Phosphinothricin-Acetyltransferase (*Streptomyces viridochromogenes*)

csr1-2: Acetohydroxysäure-Synthase (*Arabidopsis thaliana*)

gm-fad2-1: Fettsäuredehydrogenase (*Glycine max*)

5.3.1.1 GTS 40-3-2

Zulassung

Im Jahre 1994 wurde vom amerikanischen Landwirtschaftsministerium (USDA-APHIS) GTS 40-3-2, die erste gegen das Totalherbizid Glyphosat resistente transgene Sojasorte, zum Anbau und zur Verwertung in Nahrungs- und Futtermitteln zugelassen. Im Zeitraum von 1994 - 2005 folgten Zulassungen in Kanada (1995), Brasilien (1998), Kanada (1998) und zahlreichen weiteren Ländern ([Cera, 2015](#)).

Molekulargenetik

Die neue Sorte entstand durch biolistische Transformation der konventionellen Varietät A5403, die zur Reifungsgruppe V gehört. Sie gilt als ertragsstark und standfest, hat hohe Keimungsraten und gute Resistenz gegenüber bestimmten Rassen des Sojazystennematoden *Heterodera glycines*, eines Hauptverursachers von Sojaernteverlusten, und verschiedenen Stengel- und Blattkrankheiten. Das Genom von GTS 40-3-2 enthält das Gen einer glyphosattoleranten Form der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS) des CP4-Stamms von *Agrobacterium tumefaciens*. EPSPS ([2.4.3](#)) wird auch vom Biotechmais MON-603-6, mehreren anderen glyphosattoleranten Biotechmaislinien sowie der glyphosattoleranten Biotechrapslinie MON-00073-7 exprimiert. Durch konventionelle Kreuzungen mit anderen Sojakultivaren ist die Glyphosatresistenz von GTS 40-3-2 später in mehr als 1000 Sojavarietäten eingekreuzt worden.

Der Vektor, mit welchem A5403 transformiert wurde, trägt *cp4-epsps* und zusätzlich ein bakterielles β -Glucuronidasegen (*uidA*, *gus*) zur Identifizierung transformierter Zellen. Die Steuersignale des Genkonstrukts bestehen aus einem modifizierten CaMV35S-Promoter und der Terminatorregion des Nopalinsynthasegens von *Agrobacterium tumefaciens*. Die kodierende Sequenz von *cp4-epsps* ist mit einem aus der Petunie stammenden Chloroplasten-Transitpeptid verknüpft.

Molekulargenetischen Analysen zufolge ist die eingeführte DNA an zwei verschiedenen Insertionsstellen ins Sojagenom integriert. Eine enthält die vollständige *cp4-epsps*-Sequenz einschließlich der funktionsnotwendigen Steuersignale. Die zweite ist der ersten dicht benachbart und trägt lediglich ein funktionsloses 72 bp langes Genfragment. *gus* wurde nicht ins Genom der primären Transformanten integriert. Diese und die von ihnen abgeleiteten glyphosattoleranten Sojalinien besitzen deshalb weder den *gus*-Selektionsmarker noch tragen sie transgene Antibiotikaresistenzen. Wie über mehrere Generationen durchgeführte DNA-Analysen zeigten, ist das Transgen stabil ins Sojagenom integriert. Die Linie ist reinerbig (homozygot) für das eingeführte Merkmal. *cp4-epsps* wird in der ganzen Pflanze exprimiert. Es kodiert ein 456 AS langes enzymatisch aktives Polypeptid. Dessen Konzentration liegt im Samen im Mittel bei 239 $\mu\text{g/g}$ Frischgewebe und bei 495 $\mu\text{g/g}$ in den Blättern.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Vor der Kommerzialisierung ist GTS 40-3-2 in umfangreichen Feldversuchen in den USA (1991 - 1993), Kanada (1992), Puerto Rico (1993) und anderen Ländern getestet worden. Dabei sind viele agronomische Merkmale (Keimung, Wachstum, Standfestigkeit, Ertrag, Stressresistenz u. a.) der Sorte untersucht und mit denen konventioneller Sojakultivare verglichen worden. Statistisch signifikante Unterschiede wurden nicht gefunden.

Biochemische Analysen der Zusammensetzung transgener GTS 40-3-2- Sojabohnen und konventioneller Sorten ergeben keine signifikanten Unterschiede im Protein-, Fett- Faser- oder Stärkegehalt. Gleiches gilt für die Aminosäurezusammensetzung und die Fettsäureprofile. Auch der Vergleich mit glyphosatbehandelten konventionellen Sojabohnen zeigt keinen messbaren Unterschied. Die Unverträglichkeit rohen Sojamehls geht auf den Soja-Trypsininhibitor zurück, der bei Mensch und Tier die Proteinverdauung hemmt. Man findet keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität dieses Proteins zwischen transgenen GTS-40-3-2-Sojabohnen und nicht transgenen Kontrollpflanzen. Ebenso wenig findet man Unterschiede im Gehalt an pflanzlichen Lectinen und den Isoflavonglucosiden Genistein und Daidzein. Erstere können beim Menschen und bei Tieren schon in geringen Mengen toxisch wirken, letztere gehören zu den Phytoöstrogenen und haben gesundheitsfördernde oder therapeutische Wirkungen. Unter anderem senken sie den Cholesterolspiegel. Genistein und Daidzein kommen in der Sojabohne in besonders hohen Mengen vor und sind Bestandteil vieler Aufbau- und Gesundheitspräparate.

Wegen ihrer hohen Spezifität für EPSP verändert die CP4-EPSPS, welche in den Transgenikern zusätzlich zur pflanzeigenen EPSPS exprimiert wird, den Sojastoffwechsel nicht und führt nach heutigem Wissen auch nicht zur Bildung neuer biochemischer Verbindungen. GTS 40-3-2 unterscheidet sich demnach von konventionellen Sojabohnen nur durch die *cp4-epsps*-Expression und die Resistenz gegen die Glyphosatherbizide.

5.3.1.2 MON-89788-1 (MON-89788)

Zulassung

Die ebenfalls von Monsanto entwickelte erstmals 2007 in den USA und Kanada, wenig später auch in weiteren Ländern zugelassene Sorte MON-89788 ist ein verbesserter Nachfolger von GTS 40-3-2 mit nahezu identischen phänotypischen und agronomischen Eigenschaften. Wie ihr Vorläufer exprimiert MON-89788 *cp4-epsps* von *Agrobacterium tumefaciens* und ist dadurch glyphosattolerant. Sie unterscheidet sich aber durch die Verwendung der Agrolistik als Transformationsverfahren und den Einsatz eines im Promoter- und Terminatorbereich verbesserten Transgens.

Molekulargenetik

MON-89788 entstand durch agrolistische Transformation von Meristemkulturen der konventionellen Sorte A3244, eines qualitativ hochwertigen Sojakultivars der Reifungsgruppe III. Die zwischen den beiden T-DNA-Rändern des Vektors liegende Genkassette ist bei MON89788 komplexer als bei dem Transformationsplasmid der Vorläufersorte. Der Promoter ist rekombiniert und enthält die Verstärkersequenz des FMV35S-Promoters und die Promotersequenz des *tsfl*-Gens von *Arabidopsis thaliana*, welches den Elongationsfaktor EF-1-alpha der Proteinsynthese kodiert. EF-1 gehört zu den zahlreichen Proteinen, die gebraucht werden, wenn ein Ribosom eine Polypeptidkette synthetisiert. Die kodierende Sequenz beginnt mit einem Chloroplastentransitpeptid von *Arabidopsis thaliana*, gefolgt von der *cp4-epsps*-Sequenz. Die Terminatorsequenz, welche das Ende der Transkriptionseinheit markiert, entstammt dem Gen der kleinen RUBISCO-Untereinheit der Erbse. Somit sind in der EPSPS-Genkassette Sequenzelemente aus 6 verschiedenen Genen miteinander kombiniert.

DNA-Gelblots und andere molekularbiologische Analysen genomischer DNA von MON-89788 zeigen, dass das Genom von MON-89788 eine einzige vollständige Kopie der EPSPS-Genkassette enthält und frei von Vektorsequenzen ist. Das neue Gen ist stabil ins Genom integriert und vererbt sich wie ein einzelner Mendelfaktor nach den Mendelschen Regeln. Gleiches gilt für die Glyphosattoleranz. Mit Hilfe der quantitativen Polymerasekettenreaktion (PCR) konnten in der Nachkommenschaft der primären Regeneranten homozygote Individuen identifiziert werden, die eine homogene Nachkommenschaft glyphosattoleranter Pflanzen lieferten.

MON-89788 bildet ein 455 Aminosäuren langes EPSPS-Protein. Seine biochemische Charakterisierung mit mehreren unabhängigen Methoden zeigt, dass es mit dem in transgenen Colibakterienstämmen produzierten CP4-EPSPS-Protein identisch ist, das heute standardmäßig für Unbedenklichkeitsprüfungen der CP4-EPSP-Synthese verwendet wird. Im Feld gewachsene Pflanzen der Sorte bilden in den Samen ca. 140 µg/g EPSPS pro g Frischgewicht und ca. 62 µg/g in den Blättern. Die Expression des Transgens ist damit schwächer als bei der älteren Sorte GTS-40-3-2. Anscheinend hat das aber keine Auswirkungen auf die Glyphosattoleranz.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Zur Bonitätsprüfung der neuen Sorte wurden im Jahre 2005 Feldversuche an 17 verschiedenen US-amerikanischen Standorten durchgeführt, die einen weiten Bereich agronomischer und umweltlicher Wachstumsbedingungen repräsentieren und für den Großteil der kommerziellen Anbauregionen der Sojabohne in den Vereinigten Staaten typisch sind. Eine etwas niedrigere Wuchshöhe ist hiernach das einzige Merkmal, in dem sich MON89777 von der konventionellen Ausgangsform A3244 statistisch signifikant unterscheidet. Die Abweichung ist gering und liegt innerhalb der natürlichen Variationsbreite, die man beim Vergleich verschiedener Sojakultivare findet. Hinsichtlich der Krankheits- und Schädlingsresistenz und ihres Einflusses auf Insekten und andere Wirbellose unterscheidet sich MON-89777 von anderen Sojakultivaren nicht.

5.3.1.3 A2704-12

Zulassung

Die Linie A2704-12 (Liberty-Link) von Bayer Crop Science gehört zu einer Familie sehr ähnlicher glufosinat-toleranter Biotechsojasorten, die alle das Phosphinothricinacetyltransferase-Gen (*pat*) von *Streptomyces viridochromogenes* exprimieren. In den USA und Kanada ist die Sorte seit 1996 bzw. 1999 vollständig zugelassen. Mehrere Länder genehmigten den Import der Ernte und daraus hergestellter Sojaprodukte. Obwohl Jahre vorher zugelassen, sind Liberty-Link-Sojabohnen vor 2009 weder in den USA noch in Kanada in größerem Umfang angebaut worden. Der Grund war darin zu sehen, dass die größten Importeure von Soja und Sojaprodukten, die EU und China, keine Importgenehmigungen erteilt hatten und amerikanische und kanadische Farmer nicht andere Länder mit nicht zugelassenen Produkten der Agrogentechnik beliefern wollten. Im Juli

2007 veröffentlichte die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, European Food Safety Authority) eine positive Stellungnahme zur Unbedenklichkeit der Sorte (EFSA, 2007a), in der festgestellt wird, dass...“die Sojabohne A2704-12 ebenso sicher ist wie ihr nicht genetisch modifiziertes Gegenstück ... und dass es unwahrscheinlich ist, dass A2704-12 bei der beabsichtigten Verwendung irgendeinen nachteiligen Einfluss auf die menschliche oder tierische Gesundheit oder auf die Umwelt hat.“ Hiernach schlug die EFSA der Europäischen Zulassungsbehörde vor, den Import zu genehmigen, was im September 2008 geschah. Die amerikanischen Sojafarmer sehen in der Verfügbarkeit einer zweiten herbizidresistenten Biotechsojasorte einen doppelten Vorteil: Sie können erstens bei einer notwendigen Unkrautbekämpfung auf ein zweites relativ umweltverträgliches Breitbandherbizid ausweichen, wodurch der mit der Glyphosatanwendung verbundene Selektionsdruck zugunsten der Evolution glyphosatresistenter Unkräuter erheblich verringert wird. Zweitens sehen sie in der Verfügbarkeit eines Konkurrenzprodukts eine Förderung des Wettbewerbs auf dem Saatgutsektor (ASA, 2007).

Molekulargenetik

A2704-12 und ihre Verwandten entstanden durch biolistische Transformation konventioneller Sojakultivare. Das Transformationsplasmid trägt eine im Hinblick auf die Expression in Pflanzen sequenzoptimierte Form des *pat*-Gens von *Streptomyces viridochromogenes*, das von den Expressionssignalen des CaMV35S-Promoters geregelt wird. Die Aminosäuresequenz des PAT-Proteins wird durch die Optimierung der Gensequenz nicht verändert. Ein auf dem Vektor vorhandenes Antibiotikaresistenzmarker-Gen (β -Lactamase) wurde vor dessen Verwendung als Transformationsvektor gekürzt und so funktionslos gemacht. Nach DNA-Gelblotanalysen enthält das Genom von A2704-12 zwei gleichsinnig orientierte hintereinander liegende *pat*-Kopien, zwischen denen sich zwei Bruchstücke des β -Lactamase-Gens des Vektors befinden. Die Pflanzen exprimieren nur *pat*. Die PAT-Konzentration ist in allen Pflanzenteilen sehr gering. Im Grünfutter liegt sie bei 0,0031%, im Heu bei 0,0015% und im Samen bei 0,0005% des Gesamtproteins. Im Öl und in Ölprodukten wird keine PAT gefunden. Auch im Mehl findet man keine PAT-Enzymaktivität.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Wie vom Saatguthersteller, öffentlichen Forschungseinrichtungen und Züchtern in den Jahren 1992 - 1995 an verschiedenen Standorten in den USA durchgeführte agronomische Bonitätsprüfungen ergeben haben, unterscheidet sich die neue Sorte von ihrer konventionellen Ausgangsform nur durch die Glufosinatresistenz. Dies gilt nicht nur für die Ertragsleistung, sondern auch für die Resistenz gegenüber Krankheiten und Schädlingen. Insbesondere wird durch den Einbau der Vektor-DNA ins Genom des Empfängers dessen inhärente Widerstandskraft gegenüber dem Pilz *Phytophthora*, der bei empfindlichen Kultivaren Wurzelfäule verursacht und gegenüber dem Sojazystennematoden nicht verringert. Quantitative Analysen von Samen und anderen Pflanzenteilen zeigen keinerlei Unterschiede zwischen A2704-12 und der nicht transgenen Ausgangsform. Eine Ausnahme bilden geringe statistisch signifikante Abweichungen im Gehalt einiger Aminosäuren. Letztere bewegen sich aber innerhalb der Schwankungsbreite, die man beim Vergleich verschiedener Sojakultivare findet. Auch im Gehalt an Phytoöstrogenen findet man keinen Unterschied.

5.3.2 Insektenresistente Sorten

Die Sojabohne wird in ihren südlicheren Anbaugebieten, die vom Südosten der USA bis nach Argentinien reichen, von mehreren mit dem Maiszünsler und Baumwollkapselbohrer verwandten Schadschmetterlingen bedroht. Zu diesen gehören *Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens*, *Epinotia aporema* und *Rachiplusia nu*. Am verbreitetsten ist *Anticarsia gemmatalis*, während die übrigen engere Verbreitungsgebiete haben. Man bekämpft diese Schädlinge mit chemischen Insektiziden. 16% der US-amerikanischen Sojaanbauflächen mussten 2007 mit Insektiziden behandelt werden. Die chemische Schädlingsbekämpfung ist nicht immer wirksam. Das kryptische Verhalten der *Epinotia*-Raupen, die sich in die Blüten einbohren und an Staubblättern und Fruchtknoten fressen, schützt sie vor Sprühungen, was hohe Dosen und eine zeitgenaue Abstimmung der Insektizidanwendung notwendig macht. *Pseudoplusia includens* hat Resistenz gegen alle synthetischen Insektizide entwickelt. Resistenzen gegen die natürlich vorkommenden Pyrethroide und ihre synthetischen Derivate sind im Süden der Vereinigten Staaten verbreitet. Zudem sind alle chemischen Insektizide wenig spezifisch und schädigen auch harmlose Insektenpopulationen. Bemühungen der Sojazüchter, auf der Basis endogener Resistenzmerkmale insektenresistente Sorten mit guten Leistungsmerkmalen zu züchten, blieben bisher ohne Erfolg. Im Mais- und Baumwollanbau sind insektenresistente Sorten, welche δ -Endotoxine (Cry-Proteine) von *Bacillus thuringiensis* (Bt) exprimieren, seit ihrer Einführung im Jahre 1996 zum wirksamsten

Mittel zur Bekämpfung von Schadschmetterlingen geworden. Ihr Anbau hat nicht nur eine effektivere Schädlingsbekämpfung bewirkt, sondern auch den Einsatz von Pestiziden stark reduziert. Seit mehreren Jahren kennt man auch insektenresistente Biotechsojaprototypen ([MacRae u. a., 2005](#)). MON 87701, die erste zur Sojaproduktion bestimmte Bt-Sojasorte, wurde 2010 in Kanada und 2011 in den USA zugelassen und in den kommerziellen Sojaanbau eingeführt. Zugelassen sind auch aus konventionellen Kreuzungen von MON 87701 mit konventionellen Sorten oder zugelassenen Biotechsorten hervorgegangene Stapelsorten wie MON87701 x MON89788. Letztere ist insektenresistent und herbizidtolerant.

5.3.2.1 MON 87701

Molekulargenetik

MON 87701 ist eine insektenresistente Bt-Sojasorte, welche gegen die wichtigsten den Sojaanbau bedrohenden Schadschmetterlinge unempfindlich ist. Sie entstand durch gleichzeitige Einführung eines *cp4-epsps*-Gens und eines *cryIAc*-Gens in konventionelle Soja. Ersteres verleiht Glyphosatoleranz und dient hier als Selektionsmarker, um in der Gewebekulturphase des Transformationsprozesses transformierte Zellen selektieren zu können. Letzteres kodiert das Bt-Toxin, welches auch in der Bt-Maissorte DKB-89614-9 und in Bollgard-Baumwolle zum Einsatz kommt. Die beiden Gene sind in einem einzigen Transformationsschritt agrolistisch übertragen worden, wobei ein Vektorplasmid verwendet wurde, welches im Gegensatz zu den gewöhnlich in der Agrolistik benutzten Binärvektoren zwei durch Vektor-DNA getrennte T-DNA-Regionen trägt. Die erste T-DNA-Region des Vektors, T-DNA I, enthält die *cryIAc*-Sequenz. Sie ist mit dem Promoter des Gens der kleinen RUBISCO-Untereinheit von *Arabidopsis thaliana* verknüpft. Dieser Promoter bewirkt eine starke, spezifische Expression in grünen Pflanzenteilen. Die *cryIAc*-Sequenz ist mit derjenigen des *cryIAc*-Gens der Bollgard-Baumwolle identisch, hat jedoch am N-terminalen Ende eine 4 AS kodierende Transitpeptidsequenz. Es ist die Chloroplastentransitsequenz der kleinen RUBISCO-Untereinheit von *Arabidopsis thaliana*. Die zweite T-DNA-Region des Vektors, T-DNA II, enthält das *epsps*-Gen von *Agrobacterium tumefaciens*. Es liegt hinter dem FMV35S-Promoter. Auch *epsps* trägt am Genanfang eine aus *Arabidopsis* stammende Zielsequenz, welche die EPSP-Synthase nach der Synthese an den Ribosomen des Cytoplasmas in die Chloroplasten lenkt. Bei der agrolistischen Transformation werden die beiden T-DNAs nach dem Zufallsprinzip ins Sojagenom eingebaut und können so auf verschiedene Chromosomen zu liegen kommen. Wenn dies der Fall ist, findet man unter den Kreuzungsnachkommen zweier Transformanten Individuen, die nur eines der beiden Transgene tragen und erhält so markerfreie insektenresistente Sojapflanzen.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

In den Blättern von MON 87701 findet man je nach Wachstumsstadium 50 - 250 µg Bt-Toxin pro g Frischgewicht. Dies ist weit mehr als bei Bt-Mais oder Bollgard-Baumwolle. Die Menge ist so hoch, dass Blattextrakte noch in 25facher Verdünnung hochwirksam sind. Der hohe Toxinpegel ist notwendig, weil manche der in Sojafeldern zu findenden Schadschmetterlinge wesentlich höhere Konzentrationen des CryIAc-Toxins vertragen können als der Maiszünsler und der gewöhnliche Baumwollkapselbohrer. Wie erwähnt kommt die hohe Toxinkonzentration dadurch zustande, dass die *cryIAc*-Sequenz mit einer Chloroplastentransitsequenz beginnt, welche bewirkt, dass es in den Chloroplasten angereichert wird. Auch bei anderen Pflanzen, z. B. transgenem Reis, ist beobachtet worden, dass die Konzentration in grünen Pflanzenzellen synthetisierter Fremdproteine gesteigert werden kann, wenn sie mit einem Chloroplastentransportsignal verknüpft werden ([Kim u. a., 2009](#)). Nach bisherigen Feldversuchen ist MON 87701 an allen untersuchten Standorten resistent gegen die Raupen der genannten Schmetterlinge. CryIAc ist kein Enzym und verändert den Sojastoffwechsel nicht. Die neue Sorte hat wie auch andere Bt-Biotechpflanzen dieselben biochemischen und agronomischen Eigenschaften wie konventionelle Kultivare und unterscheidet sich von diesen nur durch die Expression von *cryIAc* und die Insektenresistenz.

5.3.3 Sorten mit ölsäurereichem Samenöl

Die Mehrzahl der pflanzlichen Speiseöle hat einen verglichen mit tierischen Fetten relativ hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Dies gilt auch für Sojaöl, dessen Fettsäurezusammensetzung derjenigen des Distel- und Sonnenblumenöls ähnlich ist (Tab. 20). Wegen des hohen Gehalts an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist Sojaöl nicht besonders hitzestabil und muss deshalb hydrogeniert (gehärtet) werden, bevor es zum Kochen, Braten oder Frittieren verwendet werden kann. Die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren werden durch die Hydrogenierung reduziert. Die Fetthärtung verteuert einerseits den Herstellungsprozess,

Fettsäureanteil (%)	gesättigt	einfach ungesättigt	mehrfach ungesättigt
Sonnenblumenöl	8	27	65
Rapsöl	8	60	32
Distelöl	14	24	62
Sojaöl	14	24	62
Olivenöl	19	73	8
Palmöl	46	46	8
Schweineschmalz	41	49	10
Butterfett	64	33	3
Palmkernfett	83	15	2
Kokosfett	92	6	2
Tab. 20. Mittlere Fettsäurezusammensetzung einiger Speiseöle und -fette (Wikipedia)			

andererseits steigert sie den Gehalt des Öls an gesättigten Fettsäuren und *trans*-Fettsäuren, denen man seit langem eine - allerdings bis heute nicht völlig sicher bewiesene - Mitverursachung koronarer Herzerkrankungen zuschreibt. Die Züchtung von Sorten, aus denen sich Speiseöle mit einem günstigeren Fettsäureprofil gewinnen lassen, ist deshalb ein wichtiges Ziel der Ölpflanzenzüchtung. Angestrebt wird dabei die Verringerung des Gehalts an gesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei gleichzeitiger Steigerung des Gehalts an einfach ungesättigten Fettsäuren wie der Ölsäure.

Mehrfach ungesättigte und länger-kettige Fettsäuren entstehen im pflanzlichen Lipidstoffwechsel aus Ölsäure durch Einführung weiterer C-C-Doppelbindungen und schrittweise Verlängerung der

Kohlenstoffkette um jeweils zwei C-Atome. $\delta(12)$ -Fettsäuredehydrogenase dehydrogeniert die Ölsäure, die 18 C-Atome und eine C-C-Doppelbindung besitzt (18:1), am 12. C-Atom, wodurch Linolsäure (18:2) gebildet wird. Durch Einführung einer weiteren Doppelbindung am C15 der Linolsäure entsteht Linolensäure (18:3), die wichtigste mehrfach ungesättigte Fettsäure des Sojaöls. Die nachfolgend beschriebenen Biotechsojalinien G94-1, G94-19, G168 tragen mindestens eine zusätzliche, von einem samenspezifischen Promoter geregelte Kopie des $\delta(12)$ -Fettsäuredehydrogenasgens der Sojabohne. Sowohl das endogene Fettsäuredehydrogenasgen als auch das Transgen wird transkribiert. Die Überexpression der Fettsäuredehydrogenase-mRNA führt in diesen Linien aber nicht zu einer vermehrten Synthese von Fettsäuredehydrogenase, sondern hat den gegenteiligen Effekt. Sie bewirkt, dass beide Gene durch den Mechanismus der posttranskriptionellen Genstilllegung (PTGS, [2.5.1](#)) inaktiviert werden und keine Fettsäuredehydrogenase mehr gebildet wird. Diese Genabschaltung verhindert die Bildung von Linolensäure und bewirkt die Akkumulierung von Ölsäure im Sojasamen.

5.3.3.1 G94-1, G94-19, G168

Zulassung

Diese von DuPont (Canada Agricultural Products) entwickelten Biotechsojalinien liefern ein hochwertigeres, hitzestabileres Sojaöl mit verbesserten Ernährungs- und Verarbeitungseigenschaften. Die Modifikation verhindert die Synthese von Linolensäure und länger-kettigen Fettsäuren aus Ölsäure, was zur Anreicherung von Ölsäure im Samen führt. Das Öl dieser Sorten enthält mehr Ölsäure als Raps- und Olivenöl. Die erstmalige Zulassung erfolgte 1997 in den Vereinigten Staaten, 1999 in Japan und 2000 in Kanada ([CERA, 2015](#)).

Molekulargenetik

Man erhielt diese Sorten durch biolistische Transformation von Asgrow 2396, einer ertragsstarken konventionellen Sojavarietät, mit dem Gen einer Fettsäuresaturase (GmFAD2-1) der Sojabohne. Die kodierende Sequenz des Gens (*gmFAD2-1*) wurde mit dem samenspezifischen Promoter des β -Conglycinins der Sojabohne verknüpft. Die Terminatorsequenz am Ende des Gens stammt aus dem Phaseolingen der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*). Beide Gene kodieren Hauptspeicherproteine dieser Pflanzen.

Zusammen mit *gmFad2-1* sind zwei bakterielle Markergene, *uidA* und *bla*, ins Sojagenom übertragen worden. *uidA* kodiert β -Glucuronidase und dient als visueller Farbmarker der Identifizierung transformierter Zellen. *bla*

ist ein bekannter Selektionsmarker der Gewebekultur. Die primären Transformanten wurden weiter vermehrt und mit dem Ziel gekreuzt, reinerbige Linien mit hohem Ölsäureanteil im Samen zu erhalten. Schließlich erhielt man drei Linien (G94-1, G94-19 und G168). Alle sind homozygot und tragen zwei gleichsinnig orientierte direkt hintereinander liegende *gmFad2-1*-Genkassetten.

Die beiden Transgene werden von einem samenspezifischen Promoter geregelt und nur im Samen exprimiert. Nur dort wird auch der PTGS-Mechanismus ausgelöst. In allen anderen Pflanzenteilen wird die Expression des endogenen *gmFad2-1* nicht beeinträchtigt und die Fettsäuresynthese nicht verändert. Da weder *uidA* noch *bla* exprimiert werden, bilden diese Sorten im Gegensatz zu fast allen anderen bisher kommerziell angebauten Biotechpflanzen auch keine neuen Proteine.

Alle drei Sublinien G94-1, G94-19 und G168 wurden über mehrere Generationen verfolgt und zeigen nach DNA-Gelblotanalysen dasselbe Bandenmuster, was für die stabile Integration der Transgene ins Sojagenom spricht. Wie Feldversuche ergeben haben, bleibt auch der hohe Ölsäuregehalt der Linien über mehrere Jahre unverändert. Im Gegensatz dazu schwankt der Ölsäuregehalt einer ölsäurereichen Sojamutante, die man im Laufe konventioneller Züchtungsprogramme fand, in weiten Grenzen und ist abhängig von den Umweltbedingungen ([CERA, 2015](#)).

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die Sorten liefern ein Öl, das zu über 80% aus Ölsäure besteht, verglichen mit nur 23% bei normalen Sojabohnen. Der Ölsäureanteil ist damit höher als beim Raps- und Olivenöl. Gleichzeitig ist der Gehalt an gesättigten Fettsäuren um 33% niedriger als beim normalen Sojaöl. Ölsäureangereichertes Sojaöl enthält auch keine Transfettsäuren mehr und bleibt bei Zimmertemperatur flüssig. Insgesamt stellen diese Veränderungen eine wesentliche Verbesserung der Ernährungs- und Verarbeitungsqualität des Sojaöls dar. Biochemisch unterscheiden sich die neuen Linien abgesehen vom veränderten Fettsäureprofil kaum von ihren konventionellen Vorläufern. Das Mengenverhältnis zweier wichtiger Samenproteine, Glycinin und β -Conglycinin, ist von dem der Ausgangslinien leicht verschieden. Solche Schwankungen findet man auch bei konventionellen Sojakultivaren. Dagegen findet man die bekannten im Sojasamen vorkommenden Unverträglichkeitsfaktoren Trypsininhibitor, Phytinsäure, Raffinose und Stachyose in ähnlichen Mengen wie in den Samen der nicht modifizierten Stammlinien. Auch in ihrem Gehalt an Allergenen unterscheiden sich die neuen Sorten von ihren nicht transgenen Vorläufern nicht. Nach mit Hühnern und Schweinen durchgeführten Fütterungsversuchen hat das ölfreie Sojamehl der neuen Sorten den gleichen Ernährungswert wie das der Ausgangsformen.

5.4 Prototypen

5.4.1 Resistenzzüchtung

5.4.1.1 Herbizidresistenzen

Isoxaflutol

Isoxaflutol (IFT) ist ein sehr wirksames Herbizid für die Vorauf- und frühe Nachaufbekämpfung eines breiten Spektrums von Gräsern und zweikeimblättrigen Unkräutern. Es induziert bei empfindlichen Arten eine charakteristische Ausbleichung des behandelten Blattgewebes, die zum Ausfall der Photosynthese und zum Tod der Pflanze führt. IFT hemmt 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD), die an der Synthese von Homogentisinsäure aus aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin beteiligt ist. In Pflanzen ist die HPPD-Reaktion eine Schlüsselreaktion für die Biosynthese von Plastochinon, Tocopherolen (Vitamin E) und Tocotrienolen, die Elemente der photosynthetischen Elektronentransportkette bzw. Antioxidantien sind. Die durch IFT verursachte Hemmung der HPPD ist begleitet von einer Erschöpfung des Plastochinon- und Vitamin-E-Vorrats. Die nachfolgende Abnahme des Carotinoidgehalts bewirkt die Ausbleichung, weil der Photosyntheseapparat nicht länger durch diese Pigmente stabilisiert wird. Die Molekülkomplexe der Photosysteme der Chloroplasten zerfallen, und die Pflanze geht zugrunde. Pflanzen, die mit einem *hppd*-Gen aus dem Bakterium *Pseudomonas fluorescens* transformiert wurden und das Bakterienenzym überexprimieren, können HPPD-Inhibitoren tolerieren, obwohl auch das Bakterienenzym gegen IFT empfindlich ist. Es sind sowohl kernkodierte als auch plastomkodierte IFT-Resistenzen getestet worden. Gegenüber ersteren zeigen transplastomische IFT-resistente Linien eine wesentlich höhere HPPD-Expression und ein weit höheres Resistenzniveau. Diese Pflanzen vertragen noch 2 kg/ha IFT, das zwanzigfache der für die normale Unkrautbekämpfung empfohlenen Dosis. In Blättern dieser Pflanzen macht das HPPD-Enzym ca. 5% der löslichen Proteinfraction aus. Es ist auch in anderen oberirdischen Pflanzenteilen wie Blütenkronblättern und reifen Samen nachweisbar, wenn auch in geringeren Mengen. In der Wurzel findet man keine Expression. Da zur Steuerung der *hppd*-Expression ein lichtregulierter Promoter verwendet wurde, ist dieses Expressionsverhalten verständlich. Vermutlich findet sich HPPD in allen dem Licht ausgesetzten Pflanzenteilen, welche entwickelte Plastiden führen. Nach bisher vorliegenden Sequenzierungsdaten stimmt die Aminosäuresequenz der HPPD mit der *hppd*-Sequenz überein. Dies ist nicht bei allen Plastidengen der Fall, da die Plastiden über einen Mechanismus verfügen, durch den die mRNA-Sequenzen residenter Plastidengene nach der Transkription an definierten Nukleotidpositionen verändert werden können. Nach dieser RNA-Editierung liefert die Übersetzung der Gensequenz mithilfe des genetischen Code nicht mehr die exakte Aminosäuresequenz des betreffenden Proteins ([Dufourmantel u. a., 2007](#)).

Dicamba

Dicamba (3,6-Dichlor-2-methoxy-Benzoesäure) ist ein verbreitet angewandtes, billiges und umweltfreundliches Breitbandherbizid, welches gegen viele glyphosatresistente Unkräuter wirkt. Die Verbindung gehört wie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) zur Gruppe der Auxinherbizide und wird ebenso wie dieses seit langem zur Bekämpfung zweikeimblättriger Unkräuter im Mais- und Getreidebau eingesetzt. Auxinherbizide wirken wie natürliches Auxin. In den Mengen, die beim Herbizideinsatz angewandt werden führen sie zu unorganisiertem Pflanzenwachstum und zum Tod der Pflanze. Dicamba wird im Boden relativ schnell abgebaut und ist nur wenig toxisch für Tiere und den Menschen. Natürliche Auxinherbizidresistenzen wurden bisher kaum gefunden, obwohl diese Wirkstoffe zu den am häufigsten eingesetzten Herbiziden gehören. Dicambaresistenzen könnten deshalb eine wertvolle Ergänzung der Glyphosatresistenz bilden.

In dem Bodenbakterium *Pseudomonas maltophilia* beginnt die Dicambaentgiftung mit der Umwandlung in 3,6-Dichlorsalicylsäure durch Dicambamonoxygenase (DMO). Das Enzym ist zusammen mit zwei weiteren Proteinen, einer Reduktase und einem Ferredoxinmolekül, Teil eines größeren Enzymkomplexes. Er bildet eine kurze Elektronentransportkette, in welcher Elektronen durch die Reduktase von einem Elektronenspender (NADH) auf Ferredoxin und von diesem auf die Oxygenase übertragen werden. Dort dienen sie der Aktivierung eines Sauerstoffmoleküls, welches dann die O-Methylgruppe des Dicambamoleküls oxidiert und abspaltet. Wenn das bakterielle DMO-Gen mit einer Chloroplastentransitsequenz verknüpft und in transgenen Modellpflanzen wie *Arabidopsis*, Tabak und Tomate exprimiert wird, sind für die Reaktion nicht alle drei Enzyme erforderlich, da DMO das mit dem bakteriellen Ferredoxin strukturverwandte Ferredoxin der Chloroplasten als

Elektronenspender nutzen kann. DMO zerstört die Dicambawirkung, bevor sich das Herbizid in toxischen Konzentrationen in der Pflanze anhäufen kann.

Die meisten Dikotylen sind gegenüber Dicamba recht empfindlich und werden durch die zur Unkrautbekämpfung gewöhnlich eingesetzten Konzentration von 0,3-0,6 kg/ha schwer geschädigt. Dagegen beobachtet man an transgenem Tabak, welcher das DMO-Gen trägt, kaum Symptome, selbst wenn er mit der 10fachen Konzentration behandelt wird. Ähnlich verhalten sich auch transgene DMO exprimierende Tomaten und Arabidopsispflanzen. Überraschenderweise zeigen auch transgene Tabakpflanzen, die ein DMO-Gen exprimieren, das kein Transitpeptid kodiert eine ähnlich starke Resistenz wie Pflanzen, welche das vollständige Protein bilden. Offenbar enthält das Cytoplasma grüner Pflanzenzellen bisher nicht identifizierte Moleküle, welche Elektronen auf DMO übertragen und das Ferredoxin der Chloroplasten ersetzen. Alternativ zur Transformation des Nukleoms kann die *dmo*-Sequenz zusammen mit einem starken Chloroplastenpromoter durch Plastidentransformation ins Plastom des Tabaks eingeführt werden. Transplastomischer DMO-Tabak ist hochresistent gegen Dicamba und verträgt noch Dicambaanwendungen von 100 - 200 kg/ha. Dies geht darauf zurück, dass transplastomischer DMO-Tabak etwa 20mal soviel DMO bildet wie Pflanzen, die eine nukleom-kodierte DMO mit Transitpeptid exprimieren und 40 mal soviel wie Pflanzen mit einer DMO ohne Transitpeptid.

Auch Sojabohnen sind mit *dmo* transformiert worden. Die *dmo*-Expressionskassette wurde durch agrolistische Transformation ins Nukleom von Sojapflanzen eingeführt. Die meisten der *dmo* tragenden sexuellen Nachkommen der primären Transformanten erwiesen sich als dicambaresistent und zeigen in Gewächshaus- und Feldversuchen bei Dosen von 2,8 - 5,6 kg/ha vollständige Dicambatoleranz. Über 3 Jahre durchgeführte Bonitätsprüfungen ließen erkennen, dass die Transgeniker keine schlechteren agronomischen Eigenschaften haben als konventionelle Soja. Die quantitative Analyse des Dosis-Wirkungszusammenhangs zeigt, dass ein einziges mittelstark exprimiertes *dmo* bei Tabak, Soja und wahrscheinlich auch bei anderen zweikeimblättrigen Pflanzen die Empfindlichkeit gegenüber Dicamba um mindestens den Faktor 5000 verringern kann. Dicamba wird seit mehr als 40 Jahren benutzt, um zweikeimblättrige Unkräuter zu vernichten. Neue dicambaresistente Unkräuter sind in dieser Zeit nicht aufgetreten. Dies spricht dafür, dass sich natürliche Dicambaresistenzen nur sehr langsam entwickeln können.

5.4.1.2 PTGS-induzierte Resistenz gegen das Gelbverzwergungsvirus

Die Gelbverzwergung der Sojabohne, die durch das Soja-Gelbverzwergungsvirus (soybean dwarf virus) verursacht wird, gehört zu den wirtschaftlich bedeutenden Sojakrankheiten. Typische Krankheitserscheinungen sind Zwergwuchs und vergilbende Blätter. Pflanzen mit diesen Symptomen setzen kaum noch Samen an. Da das Virus in manchen Anbaugebieten, z. B. im Norden Japans, erhebliche Ernteschäden verursachen kann, ist die Entwicklung virusresistenter Kultivare ein dringliches Ziel der Sojazüchtung. Das Gelbverzwergungsvirus gehört zu den Luteoviren. Das Genom ist ein linearer RNA-Einzelstrang mit einer Länge von 5,8 - 5,9 Kb, der in eine Proteinhülle verpackt ist. Man kennt mehrere Virusstämme, die man anhand der Krankheitssymptome und der Blattläuse, von denen die Viren übertragen werden, klassifiziert.

Die Virusvermehrung beginnt in einer infizierten Pflanzenzelle damit, dass die eingedrungene virale RNA von den pflanzlichen Ribosomen als mRNA erkannt und unmittelbar in virale Proteine übersetzt wird. Eines davon ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, welche das einzelsträngige virale RNA-Genom zu einem RNA-Doppelstrang ergänzt. Mit dem Mechanismus der posttranskriptionellen Genstilllegung (PTGS, [2.5.1](#)) haben Pflanzen ein Abwehrsystem entwickelt, mit dem sie sich bis zu einem gewissen Grade vor RNA-Viren schützen können. Wenn die Infektion erfolgreich ist, dient der von der viralen RNA-Polymerase gebildete RNA-Doppelstrang als Matrize für die Replikation des Virusgenoms. In einer virusresistenten Pflanze wird er dagegen zum Auslöser des Stilllegungsprozesses, indem er vom Dicerkomplex gebunden und in kurze doppelsträngige dsRNA-Moleküle, die siRNAs, zerlegt wird. Diese werden sodann als Einzelstränge in den RISC-Komplex eingebaut und verleihen diesem dadurch Sequenzspezifität. RISC ist eine einzelstrangspezifische Endonuklease, die einzelsträngige sequenzhomologe RNA zu spalten vermag. Wenn ein RNA-Virus eine Pflanze mit induziertem RNA-Silencing invadiert, wird die virale RNA sofort vom RISC-Komplex abgebaut.

Virale Gene, mit denen man eine Pflanze transformiert, können in dieser PTGS auslösen und Virusresistenz erzeugen. Zur Transformation werden dabei vielfach Konstrukte verwendet, welche aus einem Pflanzenpromoter und zwei identischen Genen bestehen, die gegensinnig orientiert und durch einen Spacer, einen kurzen, nicht kodierenden DNA-Abschnitt, getrennt sind. Die Transkription der von ihrem gemeinsamen Promoter gesteuerten Gene liefert eine partiell doppelsträngige RNA mit einer Haarnadelstruktur (hairpin RNA, hpRNA). Diese dient

dann dem Dicerkomplex als Substrat. Auch bei der Sojabohne sind nach diesem Prinzip transgene virusresistente Linien erhalten worden. [Tougou u. a. \(2006\)](#) verwendeten eine Genkassette, welche zwei gegensinnig orientierte, durch ein Fragment des bakteriellen β -Glucuronidasegens getrennte Gene des Hüllenproteins (CP) des Soja-Gelbverzwergungsvirus trug. In der sexuellen Nachkommenschaft der transformierten Pflanzen fand man Individuen, die nach Inokulation mit virusinfizierten Blattläusen symptomlos blieben und nachweisbare Mengen virusspezifischer siRNAs enthalten. Offenbar wird in diesen Pflanzen der PTGS-Mechanismus durch das im Genom integrierte CP-Gen-Konstrukt ausgelöst. Dies bewirkt dann den Abbau der eingedrungenen viralen RNA und macht die Pflanze virusresistent.

Auch wenn zur Transformation eine Expressionskassette benutzt wird, die nur ein einzelnes in der normalen Leserichtung orientiertes CP-Gen enthält, lassen sich virusresistente Transgeniker regenerieren ([Tougou u. a., 2007](#)). Manche ihrer Nachkommen sind gegen das Virus empfindlich, einige partiell und manche vollständig resistent. In letzteren lässt sich schon vor der Inokulation mit Blattläusen die virusspezifische siRNA nachweisen. Da hier die Transkription des CP-Transgens nicht zur Bildung partiell doppelsträngiger RNA führen kann, muss die RNA-Stillegung durch einen anderen Mechanismus ausgelöst werden. Wie dies geschieht, ist nicht sicher bekannt. Auch die Ursachen des heterogenen Resistenzniveaus der transgenen Pflanzen, die alle das CP-Gen exprimieren, ist nicht geklärt. Neben Umweltfaktoren scheint das biolistische Transformationsverfahren eine Rolle zu spielen, da dieses oft komplexe Integrationsmuster erzeugt, wobei mehrere, teils unvollständige Kopien des Transgenkonstrukts an zufälligen Positionen ins Genom der Wirtspflanze eingebaut werden. Vor diesem Hintergrund dürfte in Zukunft die agrolistische Transformation der Sojabohne an Bedeutung gewinnen, da die Integrationsmuster hier einfacher sind. Agrolistisch transformierte Pflanzen tragen oft nur eine Transgenkopie.

Vermarktete virusresistente Biotechpflanzen kennt man seit den Anfängen der Kommerzialisierung. So gibt es transgene Kartoffeln, die ein Hüllenprotein des Kartoffel-X-Virus (PVX) oder Kartoffel-Y-Virus (PVY) exprimieren. Eine weitere virusresistente Sorte exprimiert das Gen der RNA-Replikase des Kartoffelblattrollvirus (PLRV). 1996 wurde eine Papayasorte zugelassen, die das Hüllenprotein des Papaya-ring-spot-Virus PrSV bildet und resistent gegen das Virus ist. Eine im Jahre 2007 in den USA für den Freilandanbau zugelassene Pflaumensorte verfügt über PTGS-induzierte Resistenz gegen die Pflaumenpocken. Sie bildet ebenfalls ein virales Hüllenprotein. Die Pflaumenpocken sind die gefährlichste Viruserkrankung von Pflaumen-, Kirsch- und anderen Steinobstbäumen. Die Krankheit ist erstmal 1915 in Bulgarien aufgetreten und hat sich seitdem in großen Teilen Europas, dem Mittleren Osten, Indien und Chile etabliert. In Nordamerika ist sie 1999 erstmals beobachtet worden. Da Pflaumenpocken dort wirtschaftlich noch keine Rolle spielen und bisher durch Quarantänemaßnahmen unter Kontrolle gehalten werden können, ist es bisher nicht zu einer Kommerzialisierung virusresistenter Biotechpflaumen gekommen. In Europa, wo mehr als 100 Millionen Bäume befallen sind ([CERA, 2015](#)), hätte der Anbau virusresistenter Steinobstbäume bereits heute einen erheblichen wirtschaftlichen Nutzen. Durch die Expression viraler Gensequenzen können, wie diese Beispiele zeigen, Kulturpflanzen virusresistent gemacht werden, ohne dass ihre agronomischen Eigenschaften dadurch beeinträchtigt werden, und deshalb ist der Anbau virusresistenter transgener Produktionslinien der Sojabohne nur eine Frage der Zeit.

5.4.2 Verbesserung der Samenqualität

5.4.2.1 Eliminierung allergener Samenproteine durch Genstillegung

Ein signifikanter Teil der Bevölkerung (1 - 10%, je nach Population) reagiert allergisch auf bestimmte Lebensmittel. In diesen Fällen besteht die einzig mögliche Therapie darin, allergene Nahrungsmittel zu meiden. Für die Betroffenen bedeutet dies gewöhnlich Einschränkungen bei der Nahrungswahl und eine Minderung der Lebensqualität. Allergene Bestandteile kommen in vielen Nahrungsmitteln vor, so in Milch, Eiern, Fisch, Schalentieren, Weizen, Erd- und Baumnüssen und Sojabohnen. Sojabestandteile in Milchersatzprodukten, die häufig bei Säuglingen und Kleinkindern verabreicht werden, wenn diese Milchunverträglichkeit zeigen, können zu heftigen allergischen Abwehrreaktionen führen. Auch bei Tieren, die mit einer an Sojaproteinen reichen Diät gefüttert werden, findet man Sojaallergien. Schweine, Kälber und Lachse gehören zu den Nutztieren mit bekannter Sojaallergie. Die Verwendung von Sojaprodukten in der Lebensmittelproduktion hat wegen des hohen Ernährungswerts der Sojaproteine und der stetigen Verbesserung der Isolierungs- und Verarbeitungstechnik zunehmende Verbreitung gefunden und dazu geführt, dass zahlreiche Produkte Sojabestandteile enthalten. Dies ist zwar von Vorteil für den Großteil der Bevölkerung, führt aber dazu, dass es für Sojaallergiker immer schwieriger wird, sojafreie Lebensmittelprodukte zu bekommen.

Lebensmittelallergene sind fast immer natürlich vorkommende Proteine. Oft kommen in einer allergenen Nahrungsquelle mehrere Proteinallergene gleichzeitig vor. Dies gilt auch für die Sojabohne. Eines der allergenen Samenproteine der Sojabohne trägt die Bezeichnung Gly-m-Bd-30-K. Es macht etwa 1% des Gesamtproteins des Samens aus und gehört zur Proteingroßfamilie der Cystein-Papainproteasen. Es sind dies bei vielen Organismen vorkommende Enzyme, die Proteine in Peptide zerlegen und in ihrem Reaktionszentrum ein Cysteinmolekül enthalten. Auch andere Mitglieder der Cys-Proteasengroßfamilie führen zu allergischen Reaktionen. Dies gilt z. B. für ein Allergen einer Staubmilbe. Auch das Papain der Pflanzen, der Urtyp der Cys-Proteasen, kann infolge seiner Verwendung in Fleischzartmachern, Latexprodukten und Reinigungsflüssigkeiten für Kontaktlinsen Allergien auslösen.

Mehr als 65% der Sojaallergiker reagieren auf das Gly-m-Bd-30-K-Protein. Deshalb ist es als eines der bedeutendsten Sojaallergene anzusehen. Die Gene der Sojaproteinallergene wurden in den letzten Jahren identifiziert. Gly-m-Bd-30-K ist die α -Untereinheit des β -Conglycinins, eines der Hauptspeicherproteine des Sojasamens. Die Aminosäuresequenz von Gly-m-Bd-30-K ähnelt der des Papains. Im Unterschied zu allen anderen Papainproteasen trägt es anstelle eines Cysteins ein Glycin in seinem Reaktionszentrum. Es besitzt auch keine Proteaseaktivität und scheint auch keine andere Enzymaktivität zu haben. Ein erheblicher Teil des Proteins bleibt bei der industriellen Fraktionierung der Sojasamenproteine mit diesen assoziiert, so dass es in den meisten Lebensmittelprodukten enthalten ist, zu deren Herstellung Sojamehl verwendet wird.

Man kennt einige Sojalinien, in denen bestimmte Sojaallergene reduziert sind oder fehlen. Gly-m-Bd-30-K kommt jedoch in allen bisher untersuchten Sojavarietäten vor und konnte durch konventionelle Züchtung oder Mutagenese bisher nicht eliminiert werden. Mit Hilfe der RNA-Interferenztechnik ist es möglich, das Gly-m-Bd-30-K-Gen stillzulegen und Sojalinien zu entwickeln, die dieses Allergen nicht mehr enthalten. [Herman u. a., \(2003\)](#) transformierten hierzu einen konventionellen Sojakultivar mit einem Genkonstrukt, das aus dem β -Conglycininpromoter, der kodierenden Sequenz von Gly-m-Bd-30-K und dem Terminator des Phaseolins der Gartenbohne besteht. In den so erhaltenen transgenen Pflanzen führt die Überexpression des Gly-m-Bd-30-K-Gens, die durch die Einführung einer zweiten Genkopie ins Sojagenom verursacht wird, zur Stilllegung des Transgens und des endogenen Gens, was wiederum bewirkt, dass das allergene Protein nicht mehr gebildet werden kann. Derselbe Stilllegungsmechanismus bewirkt die Unterdrückung der Expression des Fettsäuredehydrogenasegens in den bereits vorgestellten ölsäureangereicherten Biotechsojalinien der G94-1-Gruppe.

Das Gly-m-Bd-30-K-Allergen ist in den transgenen Pflanzen immunologisch nicht mehr nachweisbar. Die Expression des Gens wird durch die RNA-Interferenz vollständig unterdrückt. Die Pflanzen zeigen keine gesteigerte Expression anderer Sojaallergene und unterscheiden sich morphologisch und physiologisch nicht erkennbar von ihren konventionellen Gegenstücken. Mikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Samenspeichergewebes zeigen keine auf die Anwesenheit des Transgens zurückführbare Veränderungen. Wenn man hochauflösende Trennmethode wie die zweidimensionale Gelelektrophorese und empfindliche Nachweismethoden wie die Massenspektrometrie kombiniert, kann man komplexe Mischungen von Proteinen und Peptiden analysieren und darin weit mehr als 1000 Komponenten identifizieren und quantitativ erfassen. Das Proteom einer Zelle oder eines Gewebes, d. h. die Gesamtheit aller darin vorhandenen Proteine, kann so charakterisiert und dann mit dem anderer Zellen verglichen werden. Vergleicht man so die Proteinextrakte transgener und nicht transgener Samen, so findet man, dass ihre Proteome identisch sind bis auf 5 Peptide, welche in den konventionellen Samen nachweisbar sind und den transgenen fehlen. Alle sind vermutlich Bruchstücke von Gly-m-Bd-30-K. Die vergleichende Proteomanalyse stützt somit die Annahme einer gleichartigen Proteinzusammensetzung transgener und normaler Sojasamen. Sie bestätigt auch die Vermutung, dass Gly-m-Bd-30-K keine bisher unentdeckte proteolytische Aktivität besitzt, deren Ausfall das Proteom der Transgeniker verändern könnte. Wahrscheinlich führte die im Laufe der Evolution erfolgte Substitution der Aminosäure Cystein durch Glycin im aktiven Zentrum des Proteins zum Verlust der enzymatischen Aktivität.

Die weitere Forschung wird zeigen müssen, welche agronomischen Eigenschaften die transgene Linie hat und wie verträglich ihre Samenproteine für den Menschen sind. Da Sojalinien existieren, denen bestimmte Sojaallergene fehlen, dürfte es möglich sein, durch Kreuzung dieser Sorten mit der transgenen Gly-m-Bd-30-K-freien Linie hypoallergische Sojabohnen zu erhalten, deren Samenmehl für viele Sojaallergiker unbedenklich ist. Allerdings werden noch Jahre vergehen, bis die Ergebnisse aller Züchtungsprogramme, biochemischen Analysen, Tierversuche und klinischen Studien vorliegen, die notwendig sind, um diese Hoffnung zu bestätigen.

Die Eliminierung immundominanter Allergene ist auch bei anderen Pflanzen möglich. Bereits im Jahre 1999 zeigten [Bhalla u. a.](#), dass die Expression des wichtigsten Proteinallergens (Lol p 5) des Weidelgrases (*Lolium spec.*), eines der verbreitetsten Weidegräser mit stark allergenem Pollen, mit Hilfe der RNA-Interferenztechnik unterdrückt werden kann, ohne Vitalität oder Nutzwert der Pflanze zu beeinträchtigen. Andererseits ist bisher kein Fall bekannt geworden, wo die Expression eines der in den zugelassenen Biotechpflanzen exprimierten Transgene zur Bildung neuer Allergene geführt hätte. Die Agrogentechnik birgt offenbar *per se* keine Allergiegefahr. Im Gegenteil, sie kann genutzt werden, um Allergene aus Kulturpflanzen zu entfernen und die aus diesen hergestellten Lebensmittel für Allergiker verträglich zu machen.

5.4.2.2 Verbesserung der Phosphatverfügbarkeit durch Senkung des Phytinsäuregehalts im Samen

Sojaschrot und Maismehl sind die wichtigsten Grundstoffe zur Herstellung von Tierfutter für die Schweine- und Geflügelzucht. Der für alle Organismen lebenswichtige Phosphor ist in Getreide und Ölsaaten zwar in für diesen Zweck ausreichender Menge vorhanden, ist jedoch größtenteils als Phytinsäure gebunden, welche nur von Wiederkäuern verwertet werden kann. Wie beim Mais, wo die Rolle der Phytinsäure und die Entwicklung phytinsäurearmer Biotechmaisvarietäten beschrieben wurde, ist man deshalb bei der Sojabohne bestrebt, Sorten zu entwickeln, die einen möglichst niedrigen Phytinsäuregehalt und einen entsprechend erhöhten Gehalt an frei verwertbarem Phosphat enthalten. Es werden hier dieselben Strategien wie beim Mais verfolgt. Am aussichtsreichsten ist gegenwärtig die Expression rekombinierter mikrobieller Phytasegene im Sojasamen. Anfangserfolge gibt es auch bei der samenspezifischen Unterdrückung der Phytatsynthese und/oder des intrazellulären Phytattransports.

Expression rekombinierter Phytasegene im Samen

Wie beim Mais kann der Phytatgehalt des Samens auch bei der Sojabohne durch die Expression heterologer Phytasen drastisch reduziert werden. Das *appA*-Gen des Bakteriums *E. coli* kodiert eine Phytase, welche ins Periplasma, den Raum zwischen der äußeren Membran und der Zellmembran gramnegativer Bakterien, exportiert wird und den Bakterien die Verwertung im Medium vorhandener Phytinsäure erlaubt. Der Genanfang kodiert ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid, welches den Export ins Periplasma bewirkt und entfernt werden kann, ohne dass die Enzymaktivität verändert wird. Verknüpft man das um die Signalsequenz gekürzte Gen mit dem spezifisch in den Keimblättern des Embryos aktiven Promoter eines Lectingens der Sojabohne, so erhält man ein Transgenkonstrukt, welches nach Einführung ins Sojagenom die Synthese großer Mengen von Phytase in den Keimblättern bewirkt. Durch agrolistische Transformation einer konventionellen Sojalinie hat man so eine Reihe transgener Linien erhalten, von denen eine (CAPPa) soviel Phytase im Samen bildete, dass die Phytinsäure nahezu quantitativ in P_i und Inositol umgewandelt wurde. Phytinsäure und Inositolphosphate sind in den Samen dieser Linie nicht mehr nachweisbar. Der Gesamtphosphorgehalt der Samen ist nicht reduziert. Die Phytase wird ausschließlich in den Keimblättern exprimiert. Das Merkmal wird stabil vererbt, Keimung und Entwicklung verlaufen normal, und die bisherigen Feldversuche zeigen keine Bonitätsminderung ([Bilyeu u. a., 2008](#)).

Der Phytasegehalt des Samenmehls der CAPPa-Linie reicht aus, um in beigemischten Mehlen anderer Herkunft enthaltene Phytinsäure zu spalten und daraus P_i freizusetzen. Da die CAPPa-Samen etwa die gleiche Wirkung erzielen wie kommerzielle Phytase, welche Soja- oder Maismehl zugesetzt wird, können sie die kommerziellen Phytasepräparate ersetzen. Man kennt rekombinierte Varianten der Phytase aus *Aspergillus niger* mit höherer Temperaturstabilität und besserer katalytischer Wirksamkeit. Durch Expression dieser Enzyme im Sojaembryo dürfte sich die Phytinsäureverwertung weiter optimieren lassen, so dass sich der Zusatz von Phosphat oder Phytase zum Mehl vermutlich eines Tages erübrigen wird.

Eingriffe in Phytinsäuresynthese und -transport

Ein weiterer Weg zur Reduktion des Phytatgehalts der Samen ist die gewebespezifische Abregelung des Phytattransports. Sie verhindert die Akkumulierung des Phytats in den intrazellulären Proteinspeichervakuolen des Samens. Dieses Prinzip wurde auch beim Mais erprobt und ist dort ausführlicher beschrieben worden ([3.7.2.1](#)). Die Biosynthese der Phytinsäure ist überwiegend plasmatisch und beginnt mit der Synthese von Inositol aus Glucose-6-Phosphat, welches schrittweise zu Phytinsäure phosphoryliert wird. Das Phytat verbleibt nicht im Cytoplasma, sondern wird in die ins Plasma eingelagerten Proteinspeichervakuolen gepumpt, wo es als Mischsalz abgelagert wird. Den Transport bewirkt ein vermutlich in der Vakuolenmembran verankerter ABC-Transporter, welcher das Phytat bindet und unter ATP-Verbrauch in die Speichervakuolen pumpt. Die *lpa-1*-Mutante des Mais trägt eine Mutation im ABC-Transportergen für Phytat. Man kennt vom Mais drei Klassen von

lpa-Mutanten, von denen *lpa-1*-Mutanten den niedrigsten Phytinsäuregehalt besitzen. Ca. 75% des Gesamtphosphors in Samen von *lpa1-1*-Mais ist monogastrischen Tieren zugänglich gegenüber nur 25% beim Wildtyp. Abhängig von der Futterzusammensetzung reduziert die Substituierung normaler Maiskörner mit *lpa1-1*-Mais den Phosphor in der Gülle um 10-85%. *lpa1* des Mais kodiert ein Protein mit einer Länge von 1510 Aminosäuren. Bei der *lpa1*-Mutante findet man an der Position 1432 der Polypeptidkette die Aminosäure Valin anstelle des Alanins des Wildtyps. Diese Ala-Val-Substitution ist höchstwahrscheinlich die Ursache des *lpa1*-Phänotyps. Wie beim Mais ist es bei der Sojabohne möglich, RNA-Interferenzkonstrukte des *lpa1*-Gens in den Wildtyp einzuführen und dadurch die Expression des *lpa1*-ABC-Transporters spezifisch im Embryo zu unterdrücken. Bei der Sojabohne reduziert dies den Phytatgehalt der Samen um 37 - 90%. Diese Verringerung ist mit einer äquivalenten Zunahme des P_i-Gehalts korreliert. Nach bisherigen Feldversuchen sind die besten Linien den bekannten *lpa*-Mutanten agronomisch deutlich überlegen, da sie nicht deren negative Begleitmerkmale wie gestörte Samenentwicklung, reduziertes Samengewicht oder Wachstumsstörungen zeigen. Wie beim Mais dürfte dies daran liegen, dass das *lpa1*-Gen bei den transgenen Linien im Gegensatz zu den Mutanten nur in den Keimblättern ausfällt und der Inositolstoffwechsel in allen anderen Geweben und Organen unbeeinflusst bleibt.

5.4.2.3 Steigerung des Vitamin-E-Gehalts des Sojaöls

Vitamin E ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von acht fettlöslichen Substanzen. Vier der acht bekannten Vitamin-E-Formen werden Tocopherole genannt. Abhängig von der Methylierung des Chromanrings, welcher die Grundstruktur der Tocopherole bildet, werden diese in eine α -, β -, γ - oder δ -Form unterteilt. Von diesen besitzt γ -Tocopherol die höchste Vitamin-E-Aktivität. Die wichtigsten biochemischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Vitamin E sind beim Raps beschrieben worden ([4.7.4.1](#)). 20 bis 30% der in der menschlichen Nahrung vorkommenden Vitamin-E-Menge stammen aus Ölprodukten. Sojaöl macht in den USA 70% und weltweit 30% des konsumierten Pflanzenöls aus. Die in Ölsaaten vorkommenden Tocopherole sind überwiegend schwach wirksame γ - (60 - 65%) und δ - (20 - 26%) Tocopherole. Auf das hochwirksame α -Tocopherol entfällt nur ein kleiner Teil des Gesamttocopherolgehalts. Da α -Tocopherol das Endprodukt der Tocopherolsynthese bildet und die übrigen Tocopherole Zwischenprodukte der α -Tocopherolsynthese sind, könnte die Überexpression der die Zwischenschritte katalysierenden Enzyme geeignet sein, die biologisch weniger wirksamen β -, γ - und δ -Tocopherole in α -Tocopherol umzuwandeln. Bisherige Versuche, die α -Tocopherolsynthese von Ölpflanzen zu optimieren, beruhen auf diesem Prinzip ([Scott u. a., 2004](#)). Einen deutlichen Fortschritt bildete die Überexpression zweier Enzyme von *Arabidopsis thaliana*, VTE3 und VTE4 in der Sojabohne ([Van Eenennaam u. a., 2003](#)). VTR3 addiert eine Methylgruppe an das Kondensationsprodukt von Homogentisinsäure und Phytyldiphosphat, 2-Methyl-6-phytyl-1,4-Benzochinon. VTE4 (γ -TMT), katalysiert den letzten Syntheseschritt der α -Tocopherolsynthese. Die samenspezifische Expression von VTE3 und/oder VTE4 verändert den Gesamttocopherolgehalt der Samen nicht wesentlich, bewirkt aber eine gewaltige Veränderung der Tocopherolzusammensetzung. Bei gleichzeitiger Expression beider Enzyme erhöht sich der α -Tocopherolgehalt im Samen von 10 auf ca. 90%. Dies entspricht einer 5fachen Steigerung der Vitamin-E-Aktivität.

Ähnliche Ergebnisse liefert Überexpression des γ -TMT-Gens von *Perilla frutescens*, einer in Ostasien heimischen Ölpflanze im Sojasamen ([Tavva u. a., 2007](#)). In dieser Studie wird ein Transgen eingesetzt, das aus dem Promoter des Vicilingens, eines Speicherproteingens der Erbse, der kodierenden Sequenz der *Perilla*-TMT und der Terminatorsequenz des Octopinsynthasegens von *Agrobacterium tumefaciens* besteht. Nach biolistischer Transformation embryogener Sojazellkulturen erhält man transgene Pflanzen, die fruchtbar sind und phänotypisch normale Nachkommen liefern. Ihre Samen haben den 10fachen Gehalt an α -Tocopherol und den 15fachen an β -Tocopherol des Wildtyps, was wiederum einer ca. 5fachen Steigerung der Vitamin-E-Aktivität entspricht. Neben dem höheren Vitamin-E-Gehalt haben die Pflanzen auch einen um 20% niedrigeren Gehalt an Malondialdehyd. Diese Verbindung entsteht gewöhnlich bei der Peroxidation von Lipiden durch reaktiven Sauerstoff. Ihre Abnahme ist deshalb Anzeichen eines verbesserten Oxidationsschutzes, der mit der Steigerung des α - und β -Tocopherolgehalts im Samen einhergeht.

Da man alle wichtigen Gene der Tocopherolsynthese kennt, ist es möglich, mehrere Gene dieses Synthesewegs gleichzeitig in einer Pflanze zu exprimieren. Die Vermutung ist naheliegend, dass durch Stapelung mehrerer Transgene der Vitamin-E-Gehalt von Ölpflanzen weiter gesteigert werden kann. Neben den vielen anderen Beispielen einer erfolgreichen gentechnischen Umsteuerung des pflanzlichen Stoffwechsels, die es heute gibt, zeigt auch die Optimierung der Tocopherolsynthese, dass sich der praktische Nutzen der Agrogentechnik in Produktions- und Ertragsverbesserungen keineswegs erschöpft. Ihr größtes Zukunftspotential liegt im

qualitativen Bereich, der Möglichkeit, den Ernährungs- und Gesundheitswert der heute angebauten Kultursorten zu steigern und neue Kulturpflanzen zur Produktion von Nahrungsmitteln und Pflanzenrohstoffen zu entwickeln.

6 Zuckerrübe

6.1 Biologie

6.1.1 Morphologie und Wachstum

6.1.1.1 Vegetative Phase

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* var. *altissima*, Abb. 63, 64; [OECDd, 2002](#)) ist eine zweijährige Kulturpflanze. Aus dem Samen entwickelt sich ein Keimling, der gewöhnlich zwei, gelegentlich auch 3 dunkelgrüne Blätter trägt, die sich je nach Sorte durch Blattstellung und Gestalt deutlich unterscheiden können. Anschließend wird eine Blattrosette gebildet mit etwa 20 breitflächigen, bis zu 30 cm langen dunkelgrün glänzenden und mit einer Wachsschicht überzogenen Laubblättern. Oft werden gelbe und rote Pigmente im Blatt gespeichert.



Abb. 63. Junge Zuckerrübe (*Beta vulgaris* cv. *Kawetina*). Die 75 g schwere Speicherwurzel dieser 14 Wochen alten Zuckerrübe hat bereits einen Saccharosegehalt von ca. 12 %.

Die Wurzel verdickt sich im ersten Wachstumsjahr zu einem weißen Rübenkörper. Bei der Zuckerrübe wird die Rübe überwiegend von der Wurzel, bei der Futterrübe überwiegend vom Hypokotyl gebildet. Die Zuckerrübe liegt deshalb tiefer im Boden. Die Zuckerrübe bildet eine Pfahlwurzel. Diese kann verzweigt sein und 1-2 m in die Tiefe reichen. Zahlreiche Sekundärwurzeln entspringen direkt unter der Bodenoberfläche und sind hoch verzweigt. 70% der Wurzelmasse liegen in der obersten Bodenschicht in einer Tiefe von 0 - 30 cm. Geerntet wird im ersten Vegetationsjahr, da in diesem Zeitraum Reservestoffe gespeichert werden und damit der Zuckergehalt am höchsten ist. Zum Erntezeitpunkt hat die Rübe ein Gewicht von ca. 700 bis 1200 g. Wichtigster Reservestoff der Zuckerrübenwurzel ist der Rübenzucker, die Saccharose (β -D-Fructofuranosyl- α -D-Glucopyranosid). Sie besteht aus je einem Molekül α -D-Glucose und β -D-Fructose, welche über eine α,β -1,2-glykosidische Bindung

miteinander verknüpft sind. Rübenzucker und Rohrzucker sind chemisch identisch. Moderne Sorten haben einen Zuckergehalt von 18 - 20%.

Die Saccharose wird in den Blättern synthetisiert und über das Phloem des Leitgewebes in das Speichergewebe der Zuckerrübenwurzel überführt, wo sie in den zentralen Safräumen, den Vakuolen, der Wurzelparenchymzellen gespeichert wird. In den Parenchymzellen der Leitbündelringe findet man höhere Saccharosekonzentrationen als in den zwischen diesen liegenden Parenchymzonen. Die Saccharosekonzentration ist auch nicht in allen Teilen der Rübe gleich. Am höchsten (bis 0,5 mol/l) ist sie im Zentrum des Wurzelquerschnitts mit dem größten Durchmesser und fällt von dort nach allen Richtungen ab. Wie die Pflanze die Saccharose von den Blättern in die Speicherzellen der Wurzel transportiert, ist nur teilweise verstanden. Mindestens 4 Schritte müssen am Zuckertransport beteiligt sein: die Phloembeladung im Blatt, der Ferntransport in die Wurzel, der Übergang ins Plasma der Wurzelparenchymzellen und schließlich der Transport in ihre Speichervakuolen. Man nimmt an, dass ein Energie verbrauchendes Membrantransportsystem der Vakuolenmembran die Saccharose gegen das Konzentrationsgefälle in die Vakuole transportiert.

6.1.1.2 Generative Phase

Blütenbildung

Im zweiten Jahr, der generativen Phase, entsteht ein etwa 1,5 m hoher verzweigter Blütenstand mit kleinen unscheinbaren Blüten, die einzeln oder in Knäueln von 2-8 an den Enden der Hauptachse und von dieser abgehender Seitensprosse sitzen. Die Blüten sind zwittrig und radialsymmetrisch. Die 5 Kronblätter sind durch schmale Kelchblätter getrennt. In Mitteleuropa blühen die Rüben von Juni bis August. Die Blühdauer einer Pflanze beträgt etwa 4 Wochen.

Zuckerrüben brauchen eine Kälteperiode (Vernalisierung) am Ende des ersten Wachstumsjahres, bevor sie blühen können. Temperaturen über 21 °C begünstigen das vegetative Wachstum und solche zwischen 4 und 13 °C die Einleitung des reproduktiven Wachstums. Viele kommerzielle Kultivare benötigen an 90 - 110 Tagen induktive Temperaturen, um das Blühen einzuleiten. Auch die Photoperiode (kurze Tage) hat einen starken

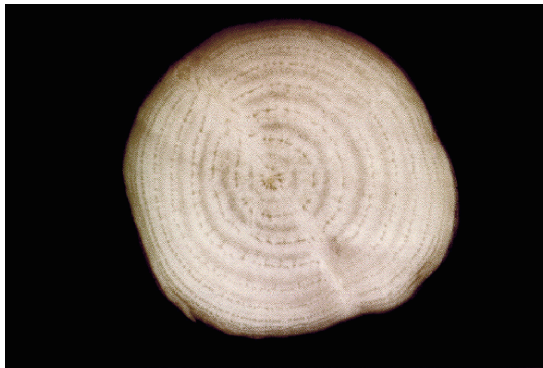


Abb. 64. Blockquerschnitt der Wurzel einer 14 Wochen alten Zuckerrübe. Das zentrale Leitbündel ist von alternierenden dunklen Leitbündelringen und hellen Zonen aus Speichergewebe (Parenchym) konzentrisch umgeben. Parenchymzellen bilden auch die hellen Zonen, welche die aneinander grenzenden Leitbündel jedes Leitbündelrings voneinander trennen. Nicht sichtbar sind die zahlreichen seitlich verlaufenden Leitungsbahnen, welche benachbarte Leitbündelzylinder verbinden und so die Verteilung der Assimilate in der gesamten Wurzel möglich machen.

Einfluss auf den Vernalisierungsprozess. Durch Spätfröste oder durch längere Perioden mit Temperaturen zwischen 0 und 8 °C nach der Aussaat kann bereits im ersten Jahr eine Vernalisierung erfolgen, die zu den unerwünschten Schossern führt. Diese Rüben blühen bereits im ersten Jahr. Sie stören die maschinelle Ernte und verursachen Mindererträge, da die Rüben klein bleiben und somit einen geringen Zuckerertrag liefern. Da sie außerdem mehrere hundert keimfähige Samen im Boden hinterlassen, die lange im Boden überdauern können, ohne ihre Keimfähigkeit zu verlieren, gefährden sie auch den zukünftigen Rübenanbau auf der gleichen Fläche. Man entfernt sie deshalb gewöhnlich schon vor der Blüte.

Die Fähigkeit zum Schossen ist genetisch determiniert. Das B-Gen (bolting) des zweiten Chromosoms verursacht das frühe Schossen und das Blühen ohne Vernalisierung. Das dominante Allel (Gentyp) ist in natürlichen Populationen von *Beta vulgaris* ssp. (subspecies) *maritima* verbreitet. Kulturformen tragen die rezessiven Allele. Die Vernalisierungsansprüche sind bei den heute kultivierten Sorten zwar unterschiedlich stark ausgeprägt; die Neigung zum Schossen ist aber dank erfolgreicher Züchtungsbemühungen durchweg gering. Eine Hauptursache des Schossens vermutet man in der unkontrollierten Bestäubung zur Saatgutgewinnung gezogener Rüben mit dem Pollen wilder Rüben aus dem Mittelmeerraum.

Selbstinkompatibilität

Die Zuckerrübe ist ein Fremdbefruchter und als solcher weitgehend selbstinkompatibel. Eine Selbstbestäubung der Blüten wird weitgehend dadurch verhindert, dass die Staubblätter früher reifen als die weiblichen Blütenorgane (morphologische Proterandrie). Griffel und Narbe sind noch nicht befruchtungsfähig, wenn sich die Blüte öffnet. Allerdings gibt es in fast jeder Population selbstbefruchtende Pflanzen. Genetisch betrachtet ist das Inkompatibilitätssystem ein Genkomplex mit mindestens 4 Genorten (Loci), jeder mit mehreren Allelen, die von weiteren Genen moduliert werden können. Die *Beta*-Populationen an den Nordseeküsten sind weitgehend selbstunverträglich. Mediterrane *Beta-maritima*-Populationen sind dagegen hochgradig selbstfertil. Tetraploide Kultivare haben eine geringere Neigung zur Selbstbefruchtung als Diploide. Selektion für Diploidie kann deshalb das Potential zur Selbstbefruchtung signifikant erhöhen.

Pollen und Bestäubung

Die Pollenkörner der Rübe sind klein, rund und haben eine warzige Oberfläche. Eine Anthere enthält ca. 17'000 Pollenkörner. 1 ha mit 25'000 Pflanzen liefert ca. 25 Trillionen Pollenkörner. Der Pollen ist ca. 24 h lang befruchtungsfähig und wird überwiegend durch den Wind übertragen, auch über weite Strecken, 5000 m und mehr. Bienen können Rübenblüten bestäuben, besuchen diese aber anscheinend nur, wenn kein anderer Pollen erreichbar ist. Tetraploide Pflanzen setzen ihren Pollen später am Tag frei als Diploide, und es gibt einen Zeitabschnitt am Morgen, wo die Narben zur Produktion triploiden Saatguts gebrauchter männlich steriler Pflanzen bereits rezeptiv sind, die Pollenspender aber noch keine effektive Pollenwolke bilden. In dieser Periode sind die männlich sterilen Mutterpflanzen am empfänglichsten für die Kontamination durch Hintergrundpollen, der von wilden einjährigen *Beta-vulgaris*-Formen stammt. Aus den Samen dieser Mutterpflanzen entwickeln sich Rüben, die im ersten Jahr blühen und keine Vernalisation brauchen. Diese Form der Saatgutkontamination kann zu einem ernsthaften Unkrautproblem werden.

Samenbildung und -verbreitung

Die Frucht der Zuckerrübe ist eine 1-2 mm große Kapsel, die bei der Keimung aufspringt. Die Kapseln enthalten gewöhnlich 3-4 Samen. Sie sind polygerm (mehrsamig). Blühende Zuckerrüben können 200 Millionen Samen pro ha produzieren. 1948 fand man in den USA eine Pflanze, deren Fruchtknoten nur einen Samen enthielt. In der Botanik bezeichnet man diese Eigenschaft als Monokarpie. Zuvor konnte monogermes Saatgut nur durch mechanische Zerkleinerung der Samenkapseln hergestellt werden. Die Monokarpie ist durch ein einziges rezessives Gen determiniert. Heute sind die meisten Kultivare monogerm. Ihre Keimlinge brauchen daher nach dem Säen nicht mehr vereinzelt zu werden.

Bei wilden Rüben wird ein großer Teil der Samen in unmittelbarer Nähe der Mutterpflanze ausgestreut. Einzelne Samen können jedoch über größere Distanzen verbreitet werden. Den Hauptverbreitungsweg der Samen mariner Rübenpopulationen über größere Entfernung bilden vermutlich Gezeitenströmungen. Zuckerrübensamen verbreiten sich nicht so leicht wie die der Wildformen. Gewöhnlich keimt in den Boden gelangter Rübensamen auch unter günstigen Keimungsbedingungen nicht im gleichen Jahr, da die Samen eine Ruheperiode (Dormanz) benötigen, um keimfähig zu werden. *Beta*-Samen sind langlebig und salzwasserresistent. 8 Jahre alte Samen haben unter Laborbedingungen immer noch eine Keimungsrate von 50%.

Zuckerrüben können unkrautig werden, wenn Wurzeln nach der Ernte im Feld zurückbleiben. Aus diesen gewachsene Volontäre können blühen und Samen bilden. In Wintergetreide findet man Volontäre der Zuckerrübe nur selten, manchmal in Sommergetreide und relativ oft in Kartoffel- oder Erbsenfeldern. Kulturrüben können auch verwildern, lassen sich aber von wilden Rüben oft nur schwer unterscheiden. Es gibt keine Hinweise darauf, dass sie sich in der Wildflora durchsetzen können.

6.1.2 Taxonomie und Genetik

Die Gattung *Beta* gehört zur Familie der Gänsefußgewächse (*Chenopodiaceae*). Von manchen Botanikern werden die *Chenopodiaceae* als eine Unterfamilie der nahe verwandten Fuchsschwanzgewächse (*Amaranthaceae*) betrachtet. Die *Chenopodiaceae* sind Kräuter, Stauden oder Halbsträucher mit einfachen, zuweilen fleischigen oder schuppenförmigen Blättern und kleinen, unscheinbaren zwittrigen Blüten. Die Gattung *Beta* wird in 4 Untergattungen gegliedert: *Beta*, *Corollinae*, *Nanae* und *Procumbentes*. Neben der Zuckerrübe umfasst die Untergattung *Beta* weitere Kulturformen, die als Futterrübe, Rote Rübe und Mangold gezogen werden. Sie stammen alle von der mediterranen Strandpflanze *Beta vulgaris ssp. maritima*, ab. Die wilde *Beta vulgaris ssp. maritima* hat dünne vielstämmige Wurzeln und niederliegende Sprosse in rosettenähnlicher Anordnung. Vermutlich ist sie ein Komplex sehr nahe verwandter Arten. Wilde *Beta-vulgaris*-Formen verteilen sich längs der Mittelmeerküsten von Südrußland, dem Nahen Osten, und den Kanarischen Inseln bis nach Madeira. Man findet sie auch an der europäischen Atlantikküste dort, wo sie mit dem Golfstrom in Kontakt kommen. In Deutschland fand man sie bisher nur auf Helgoland. Die Wildformen besiedeln einen 10 - 20 m breiten Streifen hinter der Hochwasserlinie. Im Hinterland findet man weder wilde Rüben noch Zuckerrüben in naturalisierter Form. Die Wildformen bilden ein wertvolles Genreservoir und werden in Züchtungsprogrammen genutzt.

Die Gattung *Beta* existiert in diploiden, tetraploiden und hexaploiden Formen mit einer Chromosomenzahl von $9n$ ($n = 2, 4, 6$). Das haploide Genom hat eine Größe von 758 Millionen Basenpaaren (Mbp) und gehört damit zu den kleinen Pflanzengenomen. Die Sequenzierung des Genoms einer dihaploiden Linie (KWS2320) der Zuckerrübe ist abgeschlossen (Dohm u.a., 2014). Hochauflösende auf molekularen Markern beruhende genetische Karten der 9 Chromosomen wurden bereits publiziert.

Alle wilden und kultivierten Unterarten von *Beta vulgaris* können hybridisieren. Die Hybriden entstehen spontan in der Natur und in Saatgutproduktionsgebieten. Sie sind fertil und zeigen keine chromosomalen Unverträglichkeiten. Die wichtigste Voraussetzung der Hybridisierung in natürlichen Habitaten ist die Existenz überlappender Populationen und Blühperioden. Beides ist bei *Beta vulgaris ssp. vulgaris* und *Beta vulgaris ssp. maritima* gegeben. Diese spontane Hybridenbildung ist eine Hauptursache der Entstehung unkrautiger Formen unter den Kulturrüben in Westeuropa und Nordamerika. Auch mit anderen Arten der Untergattung *Beta* vermag *Beta vulgaris* fertile Hybride zu bilden. Für die übrigen Untergattungen (*Corollinae*, *Procumbentes*, *Nanae*) gilt dies nur sehr eingeschränkt. Unter Laborbedingungen erzeugte Hybriden sind in der Mehrzahl der Fälle entweder vollkommen steril oder sterben bereits im Keimlingsstadium ab.

6.1.3 Unkräuter, Schädlinge und Krankheiten

Zuckerrübensamen enthalten nur sehr wenig Endosperm. Während und unmittelbar nach der Keimung ist der Keimling deshalb besonders anfällig gegen abiotische und biotische Stressfaktoren. Am gefährlichsten sind Unkräuter, die in den ersten 4 Wochen auflaufen, nachdem die Keimlinge das Zweiblattstadium erreicht haben. Man schätzt die durch Unkräuter verursachten Ernteverluste in den USA auf 6% und in Kanada auf 10%. Zweikeimblättrige Unkräuter richten mehr Schaden an als Gräser, da sie den Rübenkeimlingen mehr Licht wegnehmen.

Kulturrüben können von Pflanzenviren, Pilzen und Bakterien befallen werden. Das wirtschaftlich bedeutsame Rübenvergilbungsvirus (BYV und BMYV) verursacht die Rübenvergilbung. Hauptsymptom der Erkrankung ist das Gelbwerden der Blätter. Sie werden durch Blattläuse übertragen. Das Rübenmosaikvirus (beet mosaic virus, BMV), das ebenfalls durch Blattläuse übertragen wird, erzeugt weißliche oder lichtgrüne Flecken an den inneren Teilen junger Blätter. Gekräuselte und mosaikartig aufgehellte junge Blätter deuten auf den Erreger der Rübenkräuselkrankheit (beet leaf curl virus, BLCV) hin, das durch eine Rübenblattwanze (*Piesma quadrata*) übertragen wird. Das durch einen Bodenpilz (*Polymyxa betae*) übertragene necrotic yellow vein virus (BNYVV) verursacht gestauchtes Wachstum, kleine lichtgrüne Blätter und stark entwickeltes dichtes Wurzelwerk. Starker Befall führt zu Ertragsverminderungen von mehr als 50%. Man kennt auch mehrere Pilze, die Blatt- oder Wurzelwerk der Rübe befallen können. *Phoma betae* befällt die Wurzel, vor allem bei kühlem, feuchtem Wetter während des Auflaufens der Saat. In späteren Wachstumsstadien können die Blätter von *Cercospora beticola* befallen werden. Dies geschieht vor allem in der zweiten Junihälfte bei warmem Wetter mit viel Niederschlag.

Zu den tierischen Schädlingen, die man mehr oder weniger regelmäßig in Rübenfeldern findet gehören verschiedene Käfer wie der Rübenfingerkäfer (*Clivina fessor*), der Moosknopfkäfer (*Atomaria linearis*), ferner Blattläuse und Fadenwürmer (Nematoden). Zu erwähnen ist die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*), die das Rübenvergilbungsvirus überträgt. Die Laus überdauert den Winter im Ei in Kirsch- und Pfirsichbäumen. Im Frühjahr schlüpfen die Jungtiere und entwickeln sich zunächst zu flügellosen Blattläusen. Im Mai erscheinen geflügelte Formen und wandern in die Rübenfelder, wo sie sich über mehrere Generationen asexuell vermehren. Infizierte Pflanzen erkennt man an den gelblich verfärbten Blättern. Das weiße Rübenzystenälchen (*Heterodera schachtii*) ist ein 1,5 mm langer Fadenwurm, der neben Rüben vor allem Kreuzblütler befällt. Die Würmer infizieren die Wurzeln, die darauf anschwellen und schließlich aufbrechen. Die Pflanzen reifen unregelmäßig, welken, vergilben und sterben schließlich ab. Sie entwickeln ungewöhnlich viele bärtige Wurzeln, an denen viele Zysten sitzen, von denen jede ca. 250 Wurmeier enthält. Letztere können viele Jahre im Boden überdauern und die Rübenmüdigkeit des Bodens verursachen. Bei starkem Nematodenbefall kommt es zu schweren Ertragseinbußen.

6.1.4 Rübenzüchtung

Zu den allgemeinen Zielen der Rübenzüchtung gehört es, die Erträge weiter zu verbessern, die mechanisierte Ernte zu erleichtern, noch vorhandene Unkrauteigenschaften auszumerzen und das Resistenzniveau gegenüber Blatt- und Wurzelerkrankungen zu steigern. Im einzelnen versucht man dies zu erreichen durch Steigerung der Rübentrockenmasse, Verbesserung des Extraktionsverhaltens, weitere Erhöhung des Zuckergehalts, ferner die Verbesserung der Keimungsraten und die möglichst vollständige Eliminierung der Schossneigung.

Bei der Zuckerrübe kennt man diploide, triploide und tetraploide Sorten. Die seit den 70-er Jahren in Europa kultivierten Zuckerrüben waren größtenteils triploide Hybriden, obwohl die diploiden Sorten in Frankreich gegenwärtig 50% des Anbaus ausmachen. Triploide sind gewöhnlich steril, da bei der Keimzellenentwicklung ein normaler Ablauf der meiotischen Reifeteilungen nicht möglich ist und es dadurch zu nicht ausbalancierten Chromosomenkonstellationen kommt. Hinzu kommt die erbliche partielle Sterilität der bei der Saatgutgewinnung als Pollenempfänger eingesetzten Elternpflanzen. Triploides Saatgut produziert man durch Bestäubung einer diploiden Sorte, die selbst keinen fertilen Pollen bilden kann, mit dem Pollen einer tetraploiden männlich fertilen Linie. Die männliche Sterilität wird ausschließlich mütterlich vererbt, da die verantwortlichen Erbfaktoren auf dem Genom der cytoplasmatischen Mitochondrien der Eizelle und nicht im Zellkern liegen. Wie bei anderen Pflanzen ist die cytoplasmatische männliche Sterilität (CMS) das Ergebnis von Rekombinationsvorgängen im Mitochondriengenom, die von nukleären Genen beeinflusst werden.

Primitive Kulturformen der *Beta*-Artengruppe sind vermutlich schon in prähistorischer Zeit, mit Sicherheit aber im Altertum von Griechen und Römern als Blattgemüse verwendet worden, und Sorten mit verdickten Wurzeln

kannte man vermutlich ab dem 1. Jh. n. Chr. Als der Chemiker Markgraf im Jahre 1747 nachwies, dass der süß schmeckende Bestandteil der Rübe Saccharose, ist lag der Zuckergehalt bei 6,2%. Die Zuckerrübe entstand in den folgenden Jahrzehnten durch gezielte Selektion auf hohen Zuckergehalt, wodurch dieser auf 16% (um 1800) gesteigert werden konnte. Heutige Kultivare haben einen Zuckergehalt von 18 - 20%. Einen wesentlichen Fortschritt der Rübenzüchtung bildet die Entwicklung herbizidresistenter transgener Biotechzuckerrüben, deren kommerzieller Anbau 2008 in den USA und Kanada begann und die heute dort über 90% der Anbaufläche ausmachen.

6.2 Anbau und Ernte

6.2.1 Ansprüche an Boden und Klima

Die Zuckerrübe wird vorwiegend im gemäßigtem Klimabereich kultiviert. Hauptverbreitungsgebiet ist Europa, aber auch in den USA, in Kanada und in Asien wird sie angebaut. Die größten Anbauflächen liegen in den USA, der früheren Sowjetunion, Europa und China. Für einen hohen Ertrag benötigt die Zuckerrübe gemäßigte Temperaturen, viel Licht, viel Wasser und tiefgründige nährstoffreiche Böden mit guter Wasserführung. Der Wasserbedarf der Zuckerrübe ist besonders im Juli und August hoch. Am besten eignen sich humöse Lehm- und Lößböden. Ungeeignet sind arme, trockene Sandböden, zähe Tonböden und alle flachgründigen, nassen Bodenarten. Im Jugendstadium ist die Pflanze frostempfindlich. In Mitteleuropa kultiviert man die Rübe gewöhnlich unter 400 m Meereshöhe. Um hohen Zuckergehalt zu entwickeln, braucht die Rübe mindestens 170 Tage Wachstum und viel Sonne. In nördlichen Anbaugebieten ist die Wachstumsperiode mit nur 150 Tagen suboptimal.

6.2.2 Aussaat und Keimung

Mit Ausnahme von China wird im Zuckerrübenanbau fast ausschließlich monogermes pelletiertes Saatgut verwendet. Der Samen wird zur Saatgutherstellung in einem aufwendigen technischen Prozess in eine mehrschichtige Schutzhülle eingeschlossen, die Chemikalien zur Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen enthält. Pelletiertes Saatgut ist nach Größe, Form und mechanischer Beschaffenheit sehr einheitlich und eignet sich deshalb gut für die mechanische Aussaat mit Einzelkornsämaschinen. Da die Vegetationszeit 26 - 30 Wochen dauert, sät man so früh wie möglich, Ende März oder Anfang April. Das Saatgut wird überwiegend mit Einzelkornsämaschinen in Reihen im Abstand von 45 - 50 cm und einer Tiefe von 2-3 cm ausgebracht, wodurch ein Bestand von ca. 7 – 11 Pflanzen pro m² erreicht wird.

6.2.3 Wachstum und Ernte

Der Erntevorgang umfasst drei Arbeitsschritte: das Entfernen des Blattwerks und des Rübenkopfs, das Herausholen der Rübe aus dem Boden und das Aufnehmen der Rübe vom Boden. Bereits um 1850 begann die Mechanisierung des Zuckerrübenanbaus. Mit dem Rübenvollernter lassen sich heute alle drei Schritte mit einer Maschine durchführen. Die Erträge liegen bei 40 – 70 t/ha, was die Produktion von 10 t Zucker ermöglicht. Die Rübenblätter werden beim Entfernen gehäckselt und überwiegend zur Gründüngung auf dem Feld belassen. In geringem Umfang dienen sie auch als Rinderfutter. Da Zuckerrübenblätter Oxalsäure enthalten, kann dies zu Verträglichkeitsproblemen führen, wenn frische unverwelkte Blätter an Kälber verfüttert werden.

6.2.4 Weltproduktion

Die Bedeutung der Zuckerrübe als Rohstoffquelle zur Gewinnung von Zucker hat kontinuierlich abgenommen. 1925 betrug die globale Rübenzuckerproduktion 50% der Rohrzuckerproduktion. In den 1960er Jahren lag das Verhältnis bei 57% Rohr- und 43% Rübenzucker, und 1982 hatte Rübenzucker noch einen Anteil von 30% an der Gesamtproduktion. Im Wirtschaftsjahr 2005/06 wurden 109,4 Mt (74 %) aus Rohrzucker und 38,3 Mt (26 %) aus Rübenzucker produziert. In der EU werden ca. 112 Mt Rüben pro Jahr produziert, aus welchen die europäische Zuckerindustrie 13 – 15 Mt Kristallzucker gewinnt. Deutschland mit etwa 400'000 Hektar sowie Frankreich und Polen sind die Hauptproduzenten. In nahezu allen europäischen Ländern wird Zucker aus Zuckerrüben hergestellt. Fast 90% des in Europa konsumierten Zuckers stammen heute aus heimischem Anbau. Dies hat seinen Grund zu einem großen Teil in protektionistischen Schutzzöllen der EU, die den einheimischen Rübenzucker gegenüber dem preiswerteren Rohrzucker bevorteilen.

Wie in den meisten wichtigen Erzeugerländern wird auch in der EU der Zuckermarkt durch eine Marktordnung geregelt. Die Europäische Zuckermarktordnung trat 1968 inkraft und ist bis 2005 im wesentlichen unverändert geblieben. Nahezu 4 Jahrzehnte lang bildete sie eine einträgliche Basis für die Zuckerrübenbauern und die Zuckerindustrie in Europa. Sie garantierte, dass Zucker in der EU zu einem Preis verkauft werden konnte, der weit über dem Weltmarktpreis lag. Gleichzeitig sorgten massive Exportsubventionen dafür, dass europäischer Rübenzucker auf dem Weltmarkt konkurrenzfähig blieb. Die europäischen Zuckerproduzenten konnten so auf Kosten der Verbraucher und vieler zuckerexportierender Entwicklungsländer jahrzehntelang die Produktion ausweiten und den Weltmarkt bedienen. Infolge der Quersubventionierung lag der europäische Zuckerpreis

jahrelang beim Dreifachen des Weltmarktpreises und verursachte den europäischen Verbrauchern Kosten von jährlich bis zu 5 Milliarden EUR ([Europäischer Rechnungshof, 2000](#)).

Eine Klage der Zuckerrohrproduzenten Brasiliens, Thailand und Australiens, die sich durch den Agrarprotektionismus der EU benachteiligt sahen, vor der Welthandelsorganisation (WTO) läutete schließlich das Ende der bisherigen Zuckermarktordnung ein. In ihrem Schiedsspruch vom 28. April 2005 forderte sie die EU auf, ihre bisherige Subventionspolitik zu beenden und die Zuckermarktordnung mit ihren übrigen Verpflichtungen gegenüber der WTO in Einklang zu bringen. Die daraufhin eingeleitete Reform der Zuckermarktordnung trat im Wirtschaftsjahr 2006/07 inkraft und sollte bis zum 30. September 2015 gültig bleiben. Kernelemente der Reform waren: 1. die Senkung des Rübenpreises um 39,5% und des Zuckerpreises um 36%. 2. die Reduzierung der Erzeugung um 30 - 50%, die von Überbrückungshilfen aus einem Strukturfonds begleitet war. 3. ein teilweiser Ausgleich der Einkommensverluste der Zuckerrübenbauern. Der neue Zuckerreferenzpreis wurde schrittweise von 641,9 €/t Weißzucker auf 404,4 €/t gesenkt werden. Er kommt damit in die Nähe des für Weißzucker gezahlten Weltmarktpreises von weniger als 400 €/t. Vom 30. September 2017 an müssen die Zuckerrübenbauer ohne Quoten auskommen, da das EU-Parlament am 26. Juni 2013 entschied, die Quotenregelung für den EU-Zuckermarkt zu diesem Zeitpunkt zu beenden ([VSZ, 2015](#)). Die neue Verordnung wird dazu führen, dass sich die Zuckerrüben- und Zuckerproduktion aus einigen europäischen Regionen völlig zurückziehen muss. Die Zahl der Zuckerfabriken wird sich dramatisch vermindern. Gleichzeitig wächst der Druck auf die in der Produktion verbleibenden Zuckerrübenbauern, durch einen forcierten Strukturwandel den trotz des Teilausgleichs verbleibenden Einkommenseinbußen zu begegnen.

Der Anbau herbizidresistenter Biotechzuckerrüben könnte wegen der niedrigeren Produktionskosten zur Erhaltung des Zuckerrübenanbaus in Europa beitragen. Noch mehr gilt dies für Entwicklung und Anbau neuer Sorten mit verbesserten Resistenzen oder dem Potential zur Synthese für eine industrielle Verwertung geeigneter Verbindungen, die in den konventionellen Kultursorten von Zuckerrübe und Zuckerrohr nicht zu finden sind. An den wissenschaftlich-technischen Voraussetzungen des Einsatzes der Gentechnik im Agrarbereich fehlt es in Deutschland und Europa nicht. Was fehlt ist der politische Wille.

6.2.5 Verwertung der Ernte

Die Zuckerrübe wird als Rohstoff für die industrielle Zuckerproduktion angebaut. 1801, nach der erfolgreichen Selektion der weißen schlesischen Rübe, schuf der Physikochemiker Franz Carl Achard die Grundlagen der industriellen Zuckerproduktion. In der kleinen Ortschaft Kunern (Konary) in Niederschlesien nahm er 1802 seine erste Rübenzuckerfabrik in Betrieb. Ein wichtiges Nebenprodukt der Zuckergewinnung ist die Melasse, ein noch stark zuckerhaltiger Sirup, der beim Auskristallisieren der Saccharose zurückbleibt. Sie dient der industriellen Alkoholgewinnung, aber auch weiteren Gärungsprozessen, die u. a. Zitronensäure und Antibiotika liefern. Außerdem wird sie in der Futtermittelindustrie verwendet. Als Rückstände der Zuckerherstellung fallen die ausgelaugten Rübenschnitzel an, die als Futtermittel Verwendung finden. Eingedickter Zuckerrübensirup wird als Brotaufstrich gegessen, vor allem in den Anbaugebieten. Neben der stofflichen Verwertung werden Zuckerrüben auch zur Energiegewinnung genutzt. Sie bilden ein schnell vergärbares Substrat für die Bioethanolgewinnung und die Erzeugung von Biogas.

6.3 Biotechzuckerrüben

Bis 2015 wurden außerhalb Europas 3 Biotechzuckerrübensorten zum kommerziellen Anbau zugelassen. Alle tragen die bekannten Herbizidresistenzen. GTSB77 (Novartis/Monsanto) und H7-1 (Monsanto) sind glyphosattolerant. T120-7 (Bayer/Aventis Crop Science) ist tolerant gegenüber Glufosinatherbiziden. Der Anbau beschränkt sich bisher auf die USA und Kanada ([CERA, 2015](#)).

6.3.1 GTSB77

Zulassung

Die Anbauzulassung wurde 1998 in den USA erteilt. Im Zeitraum 2002 - 2004 erteilten Australien, Japan und die Philippinen Import- und Verwertungsgenehmigungen für die Ernte.

Molekulargenetik

GTSB77 bildet eine glyphosatunempfindliche 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase ([2.4.3](#)) aus dem CP4-Stamm von *Agrobacterium tumefaciens*. Die von der Zuckerrübe selbst gebildete EPSPS wird durch Glyphosat blockiert. Da EPSPS zur Synthese aromatischer Aminosäuren gebraucht wird, bewirkt die Blockade bei gewöhnlichen Rüben und Unkräutern den Ausfall zentraler Stoffwechselwege, was schnell zum Absterben der Pflanzen führt.

GTSB77 entstand durch Transformation einer männlich sterilen Zuckerrübenlinie mit *Agrobacterium tumefaciens*. Neben *cp4-epsps* exprimieren die Transformanten das β -Glucuronidasegen (*uidA*) von *E. coli*. Die das EPSPS-Transgen enthaltende Genkassette besteht aus dem FMV35S-Promoter, einer Chloroplasten-transitpeptidsequenz der Erbse (*Pisum sativum*), der kodierenden *cp4-epsps*-Sequenz und der Terminatorsequenz des Gens (*ssu*) der kleinen RUBISCO-Untereinheit der Erbse. Die *uidA*-Genkassette besteht aus dem CaMV35S-Promoter, der kodierenden Sequenz des *uidA*-Gens und dem RUBISCO-ssu-Terminator. Das *uidA*-Gen hat keinen Einfluss auf die sonstigen Eigenschaften der Pflanzen.

Nach molekulargenetischen Analysen enthalten die transformierten Pflanzen jeweils eine einzige intakte Kopie der beiden Gene. Die beiden Fremdproteine, EPSPS und GUS, sind in Blättern und Wurzeln nachweisbar. In Blättern findet man 237 ppm (EPSPS) und 3 ppm (GUS), in Wurzeln jeweils weniger als 0,5 ppm. Diese geringen Mengen reichen aus, um die Rüben gegen glyphosathaltige Totalherbizide resistent zu machen. Vererbungsstudien zeigen, dass sich die beiden Merkmale wie einzelne dominante Mendelfaktoren verhalten und über mehrere Generationen stabil vererben.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die agronomischen Merkmale der neuen Sorte sind in den Jahren 1996 - 1998 in Feldversuchen in den USA geprüft worden und ergaben keine Veränderungen gegenüber der konventionellen Ausgangssorte. In ihrer biochemischen Zusammensetzung unterscheidet sich die neue Biotechsorte nicht von konventionellen Zuckerrüben, gleichgültig, ob die Felder mit Glyphosat behandelt werden oder nicht. Zuckerrüben enthalten geringe Mengen toxischer, im Rübenzucker nicht mehr vorhandener Saponine. Die Saponinpegel konventioneller und herbizidresistenter Rüben unterscheiden sich jedoch nicht. Auch fand man bisher keine Anhaltspunkte dafür, dass die Gegenwart von EPSPS oder GUS im Zuckerrübengewebe zur Bildung neuer, in konventionellen Rüben nicht vorhandener und möglicherweise toxischer Stoffwechselprodukte führt. Der einzige phänotypisch fassbare Unterschied zu konventionellen Zuckerrüben ist die Gegenwart der beiden neuen Proteine und die Herbizidresistenz.

6.3.2 H7-1

Zulassung

H7-1 (Monsanto) ist ein weiterentwickelter Nachfolger der Sorte GTSB77. H7-1 wurde 2005 in den USA und in Kanada zum kommerziellen Anbau zugelassen. Im Zeitraum 2005 - 2007 haben mehrere Länder Importgenehmigungen für den aus der Sorte gewonnenen Rübenzucker erteilt, darunter die EU, Australien, Japan, Mexiko und die Philippinen.

Molekulargenetik

H7-1-Rüben entstanden wie ihr Vorläufer durch agrolistische Transformation. Sie tragen ebenfalls *cp4-epsps* und sind glyphosattolerant. Die Transgenkassette besteht aus dem FMV35S-Promoter, der Signalsequenz des

Chloroplastentransitpeptids der EPSP-Synthase der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), der *cp4-epsps*-Sequenz und dem Transkriptionsterminator eines Chloroplastenproteins (RUBISCO-ssu-E9) der Erbse. Im Unterschied zu GTSB77 trägt H7-1 keinen Selektionsmarker mehr. Glyphosatolerante Zellen selektierte man nach der agrolistischen Transformation in der Gewebekulturphase durch Zugabe von Glyphosat zu den Kulturmedien.

H7-1-Rüben tragen nur ein Transgen, *epsps*, welches als Einzelkopie im Zuckerrübengenom integriert ist. Im Genom der Transformanten findet man abgesehen von einem kurzen Abschnitt der T-DNA des Transformationsplasmids keine weitere Fremd-DNA. Wie bei der Vorläufersorte ist die Modifikation genetisch stabil und vererbt sich wie ein einzelner dominanter Mendelfaktor. Die mittleren Enzympegel der EPSP-Synthase liegen im Blatt bei 161 µg/g Frischgewebe (161 ppm) und in der Wurzel bei 181 µg/g Frischgewebe (181 ppm). Die Blattkonzentrationen sind somit mit denen von GTSB77 vergleichbar. Die Wurzelkonzentrationen sind höher.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Die Feldeigenschaften von H7-1 sind im Zeitraum 1998 - 2002 in den USA getestet worden. Auch in Frankreich und Deutschland (1998 - 1999) wurde die neue Sorte vorübergehend zu Versuchszwecken angebaut. Ihre agronomischen Leistungsmerkmale sind hiernach die gleichen wie bei konventionellen Zuckerrüben. Die Analyse biochemischer Parameter (Gehalt an Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten, Zucker, Aminosäuren usw.) von H7-1-Rüben mehrerer Generationen ergab keine signifikanten Abweichungen von den Werten konventioneller Linien.

6.3.3 T120-7

Zulassung

T120-7 (Bayer Crop Science) ist resistent gegenüber Phosphinothricin (Ammoniumglufosinat, [3.2.1](#)) als Wirkstoff enthaltenden Breitbandherbiziden wie Basta®, Liberty®, Finale® u. a. Zulassungen für Anbau und/oder Vermarktung gab es bisher in den USA 1998, Kanada 2000/2001 und Japan 1999 (Import).

Molekulargenetik

T120-7 entstand agrolistisch durch Transformation von Kallusgewebe einer konventionellen Zuckerrübensorte. Die T-DNA des Transformationsplasmids trug zwei Transgene, das Phosphinothricin-N-Acetyltransferase-Gen (*pat*) des Bodenbakteriums *Streptomyces viridochromogenes* und das Neomycinphosphotransferase-Gen (*nptII*) aus *E. coli*. Das vollständige *pat*-Transgen besteht aus dem CAMV35S-Promoter, der für die Expression in Pflanzen sequenzoptimierten *pat*-Sequenz und der CAMV35-S-Terminatorregion. Sein Proteinprodukt, die Phosphinothricinacetyltransferase (PAT), inaktiviert Phosphinothricin durch Acetylierung und macht den Herbizidwirkstoff dadurch unwirksam. Die Glufosinatresistenz verschiedener Mais-, Raps- und Sojalinien beruht auf dem gleichen Prinzip. Sie ist auch in den Reis eingeführt worden.

Das *nptII*-Gen besteht aus der kodierenden *nptII*-Sequenz, die zwischen Promoter und Terminator des Nopalinsynthasegens (*nos*) der T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* eingeschlossen ist. Diese Expressionssignale ermöglichen, obwohl bakteriellen Ursprungs, die Expression des *nptII*-Gens in Pflanzen und dadurch die Selektion transformierter Zellen während der Gewebekultur auf kanamycinhaltigen Nährmedien.

Die Transformanten enthalten jeweils eine einzige Kopie der beiden Transgene. Weitere Fremd-DNA ist in ihrem Genom nicht nachweisbar. Die beiden Merkmale, Glufosinat- und Kanamycinresistenz, bleiben über mehrere Generationen stabil und vererben sich nach den Mendelschen Regeln. Die Konzentration der beiden Fremdproteine ist in den Biotechrüben sehr gering, aber mit immunologischen Nachweisverfahren messbar. Man fand mittlere PAT-Konzentrationen von 127 ng/g Frischgewicht in Wurzeln und 966 ng/g im Sprosssystem. Die NPTII-Konzentrationen sind mit 20 ng/(g) (Wurzel) und 44 ng/g (Spross) noch wesentlich geringer. In Ernteprodukten (Melasse, Zucker) sind keine Fremdproteine nachweisbar.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Feldversuche mit T120-7 gab es in den USA (1994, 1996, 1997), Kanada, Europa und der früheren Sowjetunion. Weder bei den agronomischen Leistungsmerkmalen noch bei der biochemischen Zusammensetzung der Rüben fand man signifikante Abweichungen von den konventionellen Rübensorten. Insbesondere fand man keine Hinweise auf die Bildung in konventionellen Rüben nicht vorhandener potentiell toxischer Inhaltsstoffe, erhöhtes Unkrautpotential oder negative Wirkungen auf die Makro- und Mikrofauna der Rübenfelder. Die

185 Zuckerrübe

Biotechsorten unterscheiden sich von gewöhnlichen Zuckerrüben nur durch die Herbizid- bzw. Kanamycin-resistenz.

6.4 Prototypen

6.4.1 Synthese von Fructanen in der Zuckerrübe

6.4.1.1 Vorkommen und Funktionen der Fructane

Fructane (Polyfructosylsaccharosen) sind von der Saccharose abgeleitete Polysaccharide. Es sind Speicherkohlenhydrate, die in ca. 5% der Blütenpflanzen vorkommen. Man findet sie in mehreren Pflanzenfamilien und auch bei Bakterien und Pilzen. Fructane dienen Pflanzen als Reservestoffe und haben insofern dieselbe Funktion wie Stärke und Zucker. Man vermutet auch, dass sie Pflanzen vor Trockenheit und Kälte schützen können. Der Mensch kann Fructane ebenso wenig verdauen wie Zellulose, da dafür notwendige Enzyme im Verdauungstrakt fehlen.

Seit Mitte der 90-er Jahre kennt man verschiedene Studien, die darauf hindeuten, dass Fructane auch beim Gesunden eine gesundheitsfördernde Wirkung haben. Sie gelten deshalb als Präbiotika, Lebensmittelbestandteile, die eine wachstumsfördernde Wirkung auf die nützliche Darmflora ausüben und von dieser fermentiert werden. Inulin aus Chicorée ist das primär in Lebensmitteln verwendete Fructan. Mit Wasser emulgiert bildet es eine Emulsion, deren Beschaffenheit derjenigen von Fett ähnlich ist, die aber weit weniger Kalorien enthält als Triacylglycerole. Man verwendet Fructane in Joghurt, Brotaufstrichen und Speiseeis als kalorienarmer Fettersatz. Zu den gesundheitsfördernden Wirkungen zählt man die Förderung des Wachstums von Lactobazillen und Bifidobakterien im Darm, die Unterstützung der Resorption von Calcium und Magnesium, die Senkung des Cholesterol- und Insulinspiegels sowie die vorbeugende Wirkung bei Dickdarmkrebs, Gefäßerkrankungen und Osteoporose. Man betrachtet aus diesen Gründen Fructane als einen der wirksamsten Bestandteile funktioneller (gesundheitsfördernder) Lebensmittel ([Ritsema & Smeekens, 2003a](#)).

6.4.1.2 Struktur der Fructane

Fructane sind formenreiche Fructosepolymere, die mit einem Saccharosemolekül als Starteinheit beginnen. Das einfachste Fructan ist lineares Inulin. Man findet es in der Chicoréewurzel (*Cichorium intybus*), Dahlienknollen, Artischocken und dem Alant (*Inula helénium*), in dem es 1804 entdeckt wurde. Inulin besteht aus β -(1,2)-verknüpften Fructoseresten. Je nach der Bindungsstelle des Fructosylrests an die Saccharose unterscheidet man drei Fructan-Grundtypen: Bei den 1-Kestosen, zu denen das Inulin gehört, sind die Fructosylreste über β -(2,1)-Bindungen an den Fructosylrest der Saccharose verknüpft. Das einfachste Inulin ist die 1-Kestotriose. Bei den 6-Kestosen ist der Fructosylrest über eine β -(2,6)-Bindung an den Fructosylrest der Saccharose geknüpft. Fructane dieses Typs findet man bei Gräsern und Bakterien, wo man sie als Phleine bzw. Levane bezeichnet. Die Fructanbiosynthese der Bakterien unterscheidet sich wesentlich von der der Pflanzen. Bei den Neokestosen oder 6G-Kestosen hängt der Fructosylrest am C₆ des Glucosylrests der Saccharose. Diesen Fructantyp findet man bei Liliengewächsen. Besonders bei Gräsern treten vielfach alle drei Verknüpfungsarten im gleichen Makromolekül auf, so dass sich sehr komplexe Verzweigungsmuster ergeben.

6.4.1.3 Fructanbiosynthese

Pflanzliche Fructane werden in der Vakuole synthetisiert und gespeichert. Sie haben eine Kettenlänge von etwa 10 bis einigen 100 Fructoseeinheiten. Man hat aus Pflanzen 2 Enzyme isoliert, die für die Inulinsynthese verantwortlich sind, Saccharose-1-Fructosyltransferase (1-SST) und Fructan:Fructan-1-Fructosyltransferase (1FFT). 1-SST synthetisiert die kürzeste Einheit, das Trisaccharid 1-Kestose. Als Substrat dienen 2 Moleküle Saccharose, aus denen 1 Molekül 1-Kestose und ein Molekül Glucose gebildet werden. 1-FFT verwendet 1-Kestose oder Fructane mit einem höheren Polymerisationsgrad als Substrat, indem es wiederholt Fructosereste addiert.

In Liliengewächsen findet man einen anderen Inulintyp, das Neoinulin. Im Neoinulin der Liliengewächse sind zwei β -(1,2)-verknüpfte Fructoseketten an die Saccharosestarteinheit angefügt. Eine ist an das C₁ des Fructoserests gebunden wie beim Inulin, die andere an das C₆ der Glucose. Das Enzym Fructan:Fructan-6G-Fructosyltransferase (6G-FFT) ist verantwortlich für die Gegenwart dieser zweiten Kette. 6G-FFT benutzt 1-Kestose als Fructosedonor und setzt die Fructose über eine β -(2,6)-Bindung an die Glucose der Saccharose, wodurch Neokestose entsteht. Dieses Trisaccharid ist das erste der Neoinulinserie und kann an beiden Fructoseresten über β -(1,2)-Bindungen mit Fructosemolekülen verlängert werden. Aus dem Gesagten ergibt sich, dass zur Fructansynthese in Pflanzen im allgemeinen mindestens 2 Enzyme vonnöten sind, 1-SST und 1-FFT. 1-SST ist das Schlüsselenzym der Fructanbiosynthese. Es ist notwendig, um Saccharose in 1-Kestose

umzuwandeln. Diese wird dann durch 1-FFT und/oder 6G-FFT durch Addition von Fructoseresten in lineare oder verzweigte Fructane umgewandelt.

Inulin wird auch von mehreren Bakterien wie *Streptococcus* und *Bacillus* und Pilzen wie *Penicillium* und *Aspergillus* gebildet. In vielen dieser Mikroorganismen wird nur ein Enzym, Fructosyltransferase, gebraucht, um Inulin zu synthetisieren. Das von Mikroorganismen gebildete Inulin kann eine viel höhere Molekülmasse haben als das der Pflanzen und aus mehr als 100'000 Monomeren bestehen.

6.4.1.4 Biotechnologie der Fructane

Die Industrie ist wegen der positiven Eigenschaften der Fructane an diesen Kohlenhydraten interessiert. Neben der Verwendung in Lebensmitteln gibt es potentielle Anwendungen als Emulgatoren in der Kosmetikindustrie und als Additive in Papier und Textilien. Die Verwendung in größeren Mengen scheitert aber bisher an den hohen Produktionskosten. Gegenwärtig ist nur einfaches lineares Inulin aus der Chicoréewurzel kommerziell erhältlich. Bereits seit mehreren Jahren arbeitet man deshalb an der Produktion von Fructanen in transgenen Kulturpflanzen. Insbesondere die Zuckerrübe bietet sich als Wirtspflanze für bakterielle oder pflanzliche Enzyme der Fructanbiosynthese an, da sie hochproduktiv ist und den Ausgangsstoff Saccharose in großen Mengen speichern kann. In transgenen Rüben gebildete Fructane sollten biochemisch stabil sein, da die Rübe im Gegensatz zum Chicorée und anderen Pflanzen, die Fructane als Reservestoffe bilden, nicht über Fructane abbauende Enzyme verfügt. Bakterielle Enzymgene des Fructanstoffwechsels, die bereits vor den pflanzlichen kloniert worden waren, wurden bereits in die Zuckerrübe und die Artischocke eingeführt. Die so erhaltenen transgenen Pflanzen produzierten zwar hohe Fructanmengen, der Ernteertrag ging aber stark zurück, was darauf zurückgeführt wurde, dass sich die bakteriellen Fructosyltransferasen nicht in die Vakuole verfrachten lassen, selbst dann nicht, wenn sie mit geeigneten Signalsequenzen gekoppelt werden ([Turk et al., 1997](#)).

Bald nach der Klonierung der ersten pflanzlichen Fructosyltransferasen wurden auch diese in Kulturpflanzen, darunter Chicorée, Artischocke, Zuckerrübe und Kartoffel, eingeführt, worauf die Empfängerpflanzen neue Fructane bildeten. 1998 berichteten [Sévenier u. a.](#) über die Einführung von 1-SST aus Topinambur (*Helianthus tuberosus*) in die Artischocke und in die Zuckerrübe. Dies führte zur Speicherung von 1-Kestose und ebenso zur Bildung von Inulin mit einem Polymerisationsgrad von 4-5, was aber von einer starken Abnahme des Gesamtgehalts an Kohlenhydraten begleitet war. Man kann daraus schließen, dass die Einführung heterologer Fructosyltransferasen in Kulturpflanzen zur Bildung von Fructanen führt, selbst dann, wenn die Wirtspflanze selbst keine Fructane bildet ([Ritsema & Smeekens, 2003b](#)).

Als Präbiotika sind komplexe verzweigte Fructane den linearen Inulinen vermutlich überlegen, die gegenwärtig verwendet werden, weil erstere durch die Bifidobakterien des Verdauungstrakts schneller fermentiert werden. Um komplexe Fructane in der Rübe synthetisieren zu können, muss man Enzyme, welche verschiedene Verkettungstypen katalysieren können, kombinieren oder bekannte Enzyme so umkonstruieren, dass sie alternative katalytische Fähigkeiten bekommen. Transgene Zuckerrüben, welche die beiden Fructosyltransferasen 1-SST und 6G-FFT der Zwiebel exprimieren, synthetisieren Fructane. Die Einführung von 1-SST allein resultiert in der Akkumulierung von 1-Kestose und niedermolekularem Inulin mit einem Polymerisationsgrad von 3-5 bei gleichzeitiger Abnahme des Saccharosegehalts. Der Gesamtkohlenhydratgehalt wird nicht beeinträchtigt. Der aus den Wurzeln dieser Rüben gewonnene Zuckersirup hat eine ähnliche Oligosaccharidzusammensetzung wie handelsüblicher Sirup aus Chicorée. Werden beide Zwiebelenzyme in die Rübe eingeführt, lassen sich auch höhermolekulare Fructane nachweisen und man erhält bei chromatographischer Analyse des Rübensafts ein Fructanprofil, welches dem der Zwiebel gleicht. Dies zeigt, dass sich in der Zuckerrübe nach kombinierter Einführung von 1-SST und 6G-FFT Neoinuline produzieren lassen. Auch bei Einführung beider Fructosyltransferasen ist der Gesamtkohlenhydratgehalt der transgenen Rüben nicht beeinträchtigt. Pilotversuche mit Rübensirup zeigen, dass die beim Chicorée üblichen Extraktionsprozeduren auch bei der Rübe anwendbar sind. Die Fructanausbeuten sind bisher noch gering ([Weyens u. a., 2004](#)).

6.4.2 Verbesserung der Salztoleranz

In vielen Weltgegenden ist die Produktivität der Ackerböden durch Bodenversalzung schwer beeinträchtigt. Die Versalzung führt zum Aufbau für die Pflanze schädlicher Konzentrationen von Natrium- und Kaliumionen im Cytoplasma. Pflanzen können Natriumionen aus dem Cytosol entfernen, indem sie diese in die Vakuole oder aus der Zelle heraustransportieren. Dabei benutzen sie in der Plasmamembran oder in der Vakuolenmembran

lokalisierte Transportproteine (Na^+/H^+ -Antiporter), welche Natriumionen (Na^+) im Austausch gegen Protonen (H^+) durch die Membran transportieren. Dieser Austausch ist energiebedürftig und wird durch einen elektrochemischen Konzentrationsgradienten angetrieben, welchen membranständige Protonenpumpen der Plasma- und Vakuolenmembran aufrechterhalten. Bei der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) sind 2 Plasmamembran- Na^+/H^+ -Antiporter (NHX7, NHX8) und 6 Vakuolenantiporter (NHX1-NHX6) bekannt. NHX-homologe Transporter fand man in allen bisher untersuchten Pflanzen. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Entfernung von Na^+ aus dem Cytoplasma.

Die Zuckerrübe verträgt nur mäßige Salzkonzentrationen. Bisher ist die Züchtung ertragreicher Sorten, die auf versalzten Böden angebaut werden können, nicht gelungen. Die Salztoleranz kann jedoch wesentlich verbessert werden, wenn man in transgenen Rüben NHX-Transporter wie AtNHX1 ([Yang u. a., 2005](#)) oder AtNHX3 ([Liu u. a., 2008](#)) exprimiert. Die konstitutive Expression von AtNHX3 verbessert sowohl die Zuckersynthese unter Salzstress als auch die Salztoleranz der transgenen Pflanzen. Unter Laborbedingungen zeigen AtNHX3 exprimierende transgene Zuckerrüben 2 Monate nach der Salzbehandlung deutliche Wachstumsunterschiede gegenüber dem Wildtyp. Sie wachsen noch bei Na^+ -Konzentrationen von 300 mM gut, während der Wildtyp bei dieser Konzentration bereits schwer beeinträchtigt ist. Bei 500 mM NaCl stirbt der Wildtyp ab, während die Transgeniker den Salzstress überleben. Letztere bilden bei allen NaCl-Konzentrationen mehr Biomasse als der Wildtyp, was auch für die Speicherwurzel gilt. Mit wachsender NaCl-Konzentration wird der Unterschied immer deutlicher und erreicht bei 400 mM ein Maximum. Transgene Pflanzen bilden dann rund 3mal soviel Biomasse wie der Wildtyp. Die cytoplasmatischen Na^+ -Konzentrationen sind bei den transgenen Pflanzen bei allen Salzkonzentrationen niedriger als beim Wildtyp, während der K^+ -Gehalt höher ist. Den Transgenikern gelingt es demnach besser als dem Wildtyp, unter Salzstress ein normales Ionengleichgewicht aufrechtzuerhalten. Da auch die Saccharosekonzentrationen in der Speicherwurzel bei den AtNHX3-exprimierenden Pflanzen unter Salzstreß höher sind als beim Wildtyp und die transgenen Pflanzen im übrigen einen normalen Phänotyp zeigen, dürfte die Expression dieser Transporter in heterologen Wirtspflanzen ein beträchtliches Potential zur Entwicklung salztoleranter Ackerpflanzen besitzen.

6.4.3 Resistenzzüchtung

6.4.3.1 Bekämpfung der Rhizomanie

Krankheitsbild

Die Rhizomanie (Wurzelbärtigkeit) der Zuckerrübe ist eine vom Boden ausgehende Infektionskrankheit, die bei Fehlen wirksamer Gegenmaßnahmen schwere Ernteschäden hervorruft. Sie wird durch das Wurzelbärtigkeitsvirus (beet necrotic yellow vein virus, BNYYV) hervorgerufen, das durch einen Wurzelparasiten, den Schleimpilz *Polymyxa betae*, übertragen wird. Die Wurzelbärtigkeit ist erstmals 1959 in Norditalien beobachtet worden. Befallene Rüben hatten ein abnorm stark entwickeltes dunkles nekrotisches Wurzelwerk, weshalb ihr



Abb. 65. BNYYV-infizierte Zuckerrüben im Feld. ([LIZ, 2008](#))

Entdecker die Krankheit Rhizomanie (Wurzelwahn) nannte ([Canova, 1959](#)). Heute kennt man die Wurzelbärtigkeit in allen größeren Anbaubereichen der Welt. Erste Anzeichen der Krankheit sind weithin sichtbare hellgrüne oder gelbe unregelmäßig geformte Flecken in einem Zuckerrübenfeld (Abb. 65). Bei einem Virusbefall verkümmert die Pfahlwurzel der Pflanze und bildet Bündel dünner faseriger dunkelgefärbter Seitenwurzeln aus. Da diese die Hauptwurzel wie ein Bart umgeben, wird die Krankheit auch Wurzelbärtigkeit genannt. Bei massiv infizierten Pflanzen sterben die Wurzeln ab, und das Leitgewebe nimmt eine blassbraune Farbe an. An den Blättern auftretende Symptome sind primär eine Folge der reduzierten Nährstoffaufnahme durch die Wurzel. In seltenen Fällen wird die Infektion systemisch und erfasst die ganze Pflanze. Die Blätter zeigen dann neben anderen Krankheitssymptomen auch das Vergilben der Blattadern, welches dem BNYYV-Virus seinen Namen gab. Die von der

Krankheit verursachten Ernteverluste können 50 - 60%, in manchen Fällen auch nahezu 80% betragen. Sie entstehen durch das verringerte Wurzelgewicht und den reduzierten Zuckergehalt der Wurzeln. Zudem kann der Natriumgehalt der Wurzel ansteigen. Darunter leidet die Lagerfähigkeit, was weitere Verluste verursacht.

Die Krankheit wird durch *Polymyxa betae* übertragen. 10 - 15% der Sporen des Pilzes tragen das Virus, welches in den ruhenden Sporen viele Jahre im Boden überdauern kann. Auf einem Acker, wo die Krankheit einmal aufgetreten ist, wird man sie deshalb nicht mehr los. Wenn die Sporen auskeimen, setzen sie bewegliche Zoosporen frei, welche die Wand der Wurzelzellen durchdringen und dann ihr Plasma in diese injizieren. Hierbei wird das Virus auf die Pflanze übertragen, in der es sich dann vermehrt. Ob sich das Virus auch in dem Schleimpilz vermehren kann oder dieser nur als Überträger benutzt wird, ist unklar.

Das Wurzelbärtigkeitsvirus (BNYVV)

BNYVV wurde 20 Jahre nach der Entdeckung der Wurzelbärtigkeit aus infizierten Zuckerrüben isoliert ([Tamada & Baba, 1973](#)). Der Erreger gehört zu den RNA-Einzelstrangviren und hat ein mehrteiliges RNA-Genom, das aus 4, selten 5 RNA-Molekülen besteht. Man kennt 3 Haupttypen A, B und P, wobei P wegen seines hohen Infektionspotentials am gefährlichsten ist. Es gibt keine wirksamen umweltverträglichen Pestizide zur Bekämpfung des Überträgers, so dass die Resistenzzüchtung gegenwärtig die einzige Möglichkeit zur Eindämmung der Krankheit ist.

Natürliche Virusresistenzen

Die Suche nach genetischen Resistenzen begann in den 70-er Jahren und führte zur Entdeckung von *rz1*, einem dominanten Gen, welches eine partielle Rhizomanieresistenz verleiht. Es ist das einzige in der Resistenzzüchtung der letzten Jahre benutzte Resistenzgen. In der wilden Rübe (*Beta vulgaris ssp. maritima*) entdeckte man weitere partielle Resistenzfaktoren. Nach bisher bekannten genetischen Daten handelt es sich bei diesen um Allele von nur 2 benachbarten Loci auf dem 3. Chromosom des *maritima*-Genoms. Es gilt als zweifelhaft, ob im Genvorrat kultivierter und wilder Rüben ausreichend viele für eine effektive Kombinationszüchtung geeignete Resistenzfaktoren existieren. Zudem sind bereits weitere Varianten des BNYVV-Virus aufgetreten, die auch bei resistenten Kultivaren erhebliche Ernteschäden verursachen können. Der Mangel an bekannten natürlichen Resistenzfaktoren und die rasche Evolution des Virusgenoms lassen befürchten, dass der konventionellen Resistenzzüchtung kein dauerhafter Erfolg beschieden sein wird.

PTGS-vermittelte Resistenzen

Bei mehreren Kulturpflanzen, darunter Kartoffel, Gurke und Papaya, hat die Expression viraler Gene, welche Proteine der Virushülle oder virale Replikationsenzyme kodieren, bereits zur Entwicklung kommerziell nutzbarer hochresistenter transgener Sorten geführt ([CERA, 2015](#)). Auch bei der Zuckerrübe zeigten schon frühe Gewächshaus- und Feldversuche, dass transgene Pflanzen, welche das Hüllprotein des BNYVV-Virus exprimieren, reduzierte Viruspegel haben ([Mannerlöf u. a., 1996](#)). [Lennefors u. a. \(2006\)](#) transformierten Zuckerrüben mit einer invertierten 0,4 kb langen Sequenzwiederholung aus dem BNYVV-Replikasegen. Pflanzen, welche dieses Transgen exprimierten, zeigten im Gewächshaus und ebenso im Feldversuch nach Kontakt mit A-, B- und P-Typ-Virusstämmen gleich hohe oder niedrigere Viruspegel als konventionelle resistente Kontrollpflanzen. In infizierten Rüben löst die RNA des Transgens den als posttranskriptionelle Genstilllegung (PTGS, [2.5.1](#)) bekannten Abwehrmechanismus aus, welcher den Abbau viraler RNA bewirkt und so den Vermehrungszyklus des Virus unterbricht. Die transgene Resistenz gegen BNYVV bleibt erhalten, wenn die Versuchspflanzen mit mehreren Viren gleichzeitig infiziert werden. Dies ist insofern bedeutsam, als manche Rübenviren wie das beet yellow virus die Fähigkeit haben, den PTGS-Verteidigungsmechanismus der Pflanze wirksam zu hemmen. Da die BNYVV-Resistenz durch verbreitet vorkommende Mischinfektionen nicht beeinträchtigt wird, könnte sie sich im Feld als dauerhaft erweisen.

Die Zuckerrübe gehört zu den Pflanzen, bei denen die Regeneration kompletter Individuen aus Zell- oder Gewebekulturen schwierig ist. Solange sich ein neues Resistenzsystem noch in der Testphase befindet, lässt sich der mit der Regeneration verbundene Aufwand vermeiden, wenn man sich mit einem transienten Expressionssystem begnügt und die Transformation nicht mit *Agrobacterium tumefaciens* sondern mit der verwandten Art *Agrobacterium rhizogenes* (nach neuerer Nomenklatur *Rhizobium rhizogenes*) durchführt. Es ist ein gramnegatives Bodenbakterium, welches bei zweikeimblättrigen Pflanzen die Haarwurzelkrankheit auslöst. An der Infektionsstelle induziert es die Bildung zahlreicher vielfach verzweigter oft seitlich (plagiotrop) wachsender Haarwurzeln. Das überentwickelte haarige Wurzelsystem und die Bildung runzeliger Blätter sind charakteristisch für den Phänotyp. Die Bakterien besitzen wurzelinduzierende (Ri, root inducing) Plasmide, die den Ti (tumor inducing) Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens* entsprechen. Wie diese besitzen sie eine T-DNA, welche bei der Infektion in die Pflanzenzellen gelangt und ins Pflanzengenom eingebaut wird. Nach Integration und Expression der T-DNA-Gene des Ri-Plasmids entwickelt sich der haarwurzelige Phänotyp. Zur

Transformation werden Rübenkeimlinge am Hypokotyl, der Übergangsstelle von Sproßsystem und Wurzelwerk zerschnitten. Anschließend wird der Spross an der Schnittstelle mit einer Agrobaktériensuspension behandelt und auf ein Kanamycin enthaltendes Selektionsmedium gesetzt. Die Agrobakterien infizieren nun das Wundgewebe und die wurzellosen Keimlinge bilden 8 - 10 Tage nach der Inokulation Adventivwurzeln, die kanamycinresistent sind. Die Wurzelbildungsrate liegt bei 96%. Nicht transformierte Keimlinge sind kanamycinsensitiv und bilden keine Wurzeln. Die entstehenden Komplettpflanzen sind Chimären. Das Wurzelwerk ist transformiert, die grünen Pflanzenteile nicht. Zum Aufbau einer PTGS-vermittelten Virusresistenz in der Zuckerrübe sind T-DNA-Vektoren entwickelt und in einen geeigneten *Agrobacterium-rhizogenes*-Stamm eingeführt worden, welche auf der T-DNA ein Haarnadelkonstrukt tragen, das aus zwei identischen durch ein Intron getrennten invertiert angeordneten Abschnitten des RNA-Replikasegens des BNYVV-Virus besteht. Die von diesem DNA-Abschnitt transkribierte RNA nimmt eine doppelsträngige Haarnadelstruktur an und wird dadurch zum Substrat des Dicerkomplexes. Damit kommt die PTGS in Gang. Sie führt zum Abbau des viralen RNA-Replikasegens, was den Vermehrungszyklus des Virus unterbricht. Die Ausschaltung der viralen Replikase im Wurzelkörper transformierter Rübenkeimlinge bewirkt eine wesentliche Steigerung der BNYVV-Resistenz. Es werden nur die oberirdischen Pflanzenteile stark infiziert. Im Wurzelbereich transformierter Keimlinge treten erste Krankheitssymptome 7 - 10 Tage später auf als bei den Kontrollen und 21 Tage nach der Inokulation erweisen sich noch mehr als 80% der Testpflanzen als virusfrei. Der Virustiter der restlichen liegt nur wenig über der Nachweisgrenze des immunologischen Virustests ([Pavli u. a., 2010](#)).

Resistenzaufbau durch Expression bakterieller Harpin-Proteine

Seit ihrem Bekanntwerden hat sich die Rhizomanie in allen bedeutenderen Zuckerrübenanbauländern ausgebreitet. Das Virus evolviert anscheinend schnell und hat bereits A-Stämme entwickelt, welche die natürliche *rz1*-Resistenz überwinden können. Man beobachtet auch bereits die Ausbreitung hochpathogener Varianten des P-Virustyps. Unter diesen Umständen ist es zweckmäßig, bei der Entwicklung transgener Virusresistenzen nach Möglichkeit mehrere verschiedene Resistenzmechanismen auszunutzen und so die Resistenzrevolution zu verzögern. Die besten Ergebnisse liefert bisher die PTGS-vermittelte Virusresistenz. Eine weitere Möglichkeit, die Rübe resistent gegen die Rhizomanie zu machen ist die Expression bakterieller Harpin-Proteine. Harpins sind von *Pseudomonas*, *Erwinia* und noch anderen phytopathogenen Bakterien gebildete Proteine, welche Bauteile eines membranständigen Translokationskomplexes sind. Das erste Harpin-Gen, *hrpN*, wurde 1992 im Genom des Feuerbrands (*Erwinia amylophora*) der Kernobstbäume und anderer Rosengewächse entdeckt ([Wei u. a., 1992](#)). Sein Produkt wurde Harpin genannt und wurde zum Namensgeber der Harpinproteinfamilie. Harpin ist ein 44 kDa großes Membranprotein, welches zusammen mit anderen Harpinproteinen ein aus ca. 13 Proteinen aufgebautes bakterielles Sekretionssystem des Typus III bildet. Seine Aufgabe besteht darin, die von phytopathogenen Bakterien während des Infektionsprozesses gebildeten Virulenz- und Avirulenzproteine (Vr, Avr) durch die bakteriellen und pflanzlichen Zellwände und -membranen zu schleusen und ins pflanzliche Zytoplasma zu bringen. Die *vr*- und *avr*-Gene bestimmen die Wirtsspezifität. Ihre Produkte wirken als Effektoren und lösen in einer infizierten Pflanzenzelle eine von zwei möglichen Reaktionsketten aus: In empfindlichen Wirtspflanzen bewirken sie nach einer mehrtägigen Vermehrungsphase die Erkrankung. In resistenten Wirtspflanzen und Nichtwirtspflanzen kommt es zu einer heftigen als HR (Hypersensitive Reaction) bekannten Abwehrreaktion. Die HR ist ein schneller lokal begrenzter Zelltod, der bei Erkennung des Erregers induziert wird und dessen Ausbreitung im infizierten Pflanzengewebe verhindert. Bei natürlicher Infektionsdichte trifft der Zelltod nur einzelne, in gesundes erfolgreich verteidigtes Gewebe eingestreute Zellen. Bei experimenteller Inokulation mit konzentrierten Bakteriensuspensionen geht das gesamte infiltrierte Gewebe innerhalb von 24 h zugrunde. Die Harpingene (*hrp*) bilden gewöhnlich einen kohärenten 20 - 40 kb langen Genkomplex im Bakteriengenom. Es bestehen Sequenzhomologien und funktionelle Beziehungen zu den Komponenten des T-DNA-Translokationskomplexes der Agrobakterien und der Typ-III-Sekretionssysteme human- und tierpathogener Bakterien (*Shigella*, *Yersinia* u. a.), welche diese Systeme nutzen, um Effektorproteine in ihre Wirtszellen zu übertragen. Von transgenen Pflanzen gebildete Harpins können Resistenz erzeugen, indem sie in diesen die HR auslösen, wenn man Blätter mit BNYVV-Konzentraten inokuliert.

HrpZ_{P_{sph}} ist ein Harpinprotein von *Pseudomonas syringae* pv (Pathovar) *phaseolicola*, des Erregers der Fleckfleckkrankheit der Bohne. Sein Gen, *hrpZ_{P_{sph}}*, ist mit dem CaMV35S-Promoter und der Signalsequenz eines PR-Gens (pathogenesis related) des Tabaks verknüpft und in die mit dem Kulturtabak eng verwandte australische Art *Nicotiana benthamiana* eingeführt worden. Das Signalpeptid wird in den transgenen Pflanzen verarbeitet und bewirkt, dass das gebildete Harpinprotein in den Apoplasten, den flüssigkeitserfüllten

Interzellularraum, der für pflanzliche Gewebe charakteristisch ist, exportiert wird. Nach Inokulation mit BNYVV zeigen die Pflanzen eine deutlich gesteigerte Virusresistenz. Transgene *Nicotiana*-Pflanzen, die ein Harpin ohne Signalpeptid exprimieren, zeigen keine Resistenz.

Das rekombinierte Transgen ist durch Transformation von Zuckerrübenwurzeln mit *Agrobacterium rhizogenes* auch in die Rübe übertragen worden. Nach Inokulation der Wurzeln mit dem Virus zeigte sich, dass diese ebenso wie *Nicotiana-benthamiana*-Pflanzen durch die Transformation erheblich resistenter werden. Die Wurzeltransformation mit *Agrobacterium rhizogenes* liefert Chimären. Nur das Wurzelwerk ist transgen, während Spross und Blätter genetisch nicht verändert werden. Die oberirdischen Pflanzenteile sind nicht transformiert und gegen das Virus empfindlich. Nach Inokulation mit dem Virus entwickeln sie aber schwächere Krankheitssymptome als Kontrollpflanzen, weshalb es möglich ist, dass sie eine begrenzte systemisch erworbene Resistenz (SAR) besitzen ([Pavli u. a., 2011](#)). HrpZ_{PspH} trägt ein Membrantransportsignal und wird in den Apoplasten abgegeben. Transgene *Nicotiana*-Pflanzen, die ein Harpin ohne Signalpeptid exprimieren, zeigen keine Resistenz. Harpin-Proteine können die HR auch auslösen, wenn man sie in gereinigter Form in den Apoplasten injiziert. Der Wirkungsort von HrpZ_{PspH} liegt deshalb wahrscheinlich im Apoplasten. Dies muss nicht für alle Harpins gelten. HrpJ von *Pseudomonas syringae* hat eine Doppelfunktion. Es ist einerseits ein funktionsnotwendiger Strukturbestandteil des Typ-III-Translokationskomplexes des Bakteriums; andererseits wird es von ersterem in geringer Menge in die Pflanzenzelle injiziert und ist dort Teil des Virulenzmechanismus ([Crabill u. a., 2012](#)).

Bei der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* kann die Virusresistenz weiter gesteigert werden, wenn man die PTGS-induzierte Resistenz mit der Expression eines Harpins kombiniert. Versuchspflanzen wurden hierzu mit einer Suspension zweier Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Ein Stamm trug den T-DNA-Expressionsvektor mit dem Haarnadelkonstrukt des BNYVV-Replikasegens, der andere denjenigen mit dem *hrpZ*-Gen von *Pseudomonas phaseolicola*. Inokuliert man mit dieser Bakterienmischung Blattexplantate, so werden Zellen des Blattgewebes von beiden Bakterienstämmen infiziert und übernehmen beide Transgene. Der anschließende Regenerationsprozess liefert dann vollständige Pflanzen, welche beide Transgene exprimieren. Die Gene sind noch in der 2. Folgegeneration der Transformanten aktiv und verleihen nahezu vollständige Rhizomanieresistenz. Wahrscheinlich entsteht diese durch einfache additive Überlagerung der beiden Einzelresistenzen. Doppelt resistente ditransgene Zuckerrüben gibt es bisher noch nicht. Da in der Zuckerrübe beide Resistenzmechanismen funktionieren, werden sich mit dem temporären Haarwurzelttransformationssystem vermutlich ditransgene chimäre Zuckerrüben erzeugen lassen, deren Wurzeln beide Transgene exprimieren und ein ähnlich hohes Resistenzniveau besitzen ([Pavli u. a., 2012](#)). Das größte Hindernis in der Resistenzzüchtung ist gegenwärtig das noch unzureichende Grundlagenwissen um die Wirkungsweise der natürlichen Resistenzgene, die molekularen Details der Virusvermehrung und die viralen Wechselwirkungen bei Mischinfektionen.

7 Baumwolle

7.1 Biologie

7.1.1 Morphologie

Baumwolle (*Gossypium*) ist eine Gattung aus der Familie der Malvengewächse (*Malvaceae*). Da die Stengel der Pflanze nicht verholzen, ist die Baumwolle botanisch gesehen trotz des Namens kein Baum, sondern eine Staude. Die kultivierten *Gossypium*-Arten können bis ca. 1,5 m hoch werden. Nach der Keimung (Abb. 66)



Abb. 66. Baumwollkeimlinge; jeder Keimling hat 2 Keimblätter und 2 Folgeblätter (Cotton Insect Corner, [CIC, 2015](#)).



Abb. 67. Blühreife Baumwolle (Cotton Insect Corner, [CIC, 2015](#)).

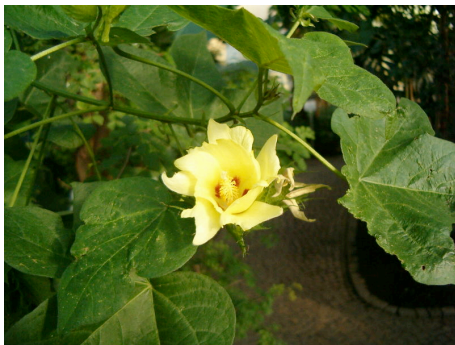


Abb. 68. Baumwollblüte (Cotton Insect Corner; [CIC, 2015](#)).

entwickelt die Pflanze eine Hauptachse, an der die ersten Blätter spiralig angeordnet sind. Sie sind 10 - 15 cm lang, 3-5fach gelappt oder handförmig geteilt. Nach Ausbildung der Hauptachse beginnt sich das wachsende Sprosssystem zu verzweigen. Die Verzweigung beginnt mit der Bildung von Seitensprossen, die aus Sprossknospen hervorgehen, welche an der Hauptachse in Blattachseln gebildet werden.

4-5 Wochen nach der Aussaat erreichen die Pflanzen die Blühreife (Abb. 67). Von der Bildung der ersten Blütenknospen bis zur Blütenöffnung vergehen gewöhnlich ca. 25 Tage. Die Blüten der Malvengewächse haben zahlreiche Staubblätter, welche mit dem Stempel zu einer Röhre, dem Androgynophor, verwachsen sind. Die meisten *Gossypium*arten haben eintägige (ephemerische) Blüten: Sie öffnen sich in der Morgendämmerung und welken am Abend desselben Tages. *Gossypium hirsutum* blüht zunächst cremig weiß. Mit der Bestäubung verfärben sich die Blüten rosarot und werden dann abgeworfen. Die Blüten von *G. barbadense* (Abb. 68) sind bei der Öffnung gelb und werden bei der Bestäubung ebenfalls rosa. Bald nach der Blütenöffnung trocknen die Staubblätter und geben ihren Pollen frei. Baumwolle ist ein fakultativer Selbstbefruchter und neigt zur Auskreuzung, falls bestäubende Insekten die Blüten besuchen. Da der Pollen ziemlich schwer ist, wird er durch den Wind nur schlecht verbreitet. Der Pollen bleibt ca. 12 Stunden lebensfähig. Von der Bestäubung einer Blüte bis zur Befruchtung vergehen 12 - 30 Stunden. Wo Insektizide eingesetzt werden, wird die Fremdbestäubung unterdrückt.

Wachstum und Entwicklung der Frucht beginnen unmittelbar nach der Befruchtung und erreichen nach 7 - 18 Tagen ihre stärkste Wachstumsphase. Die unreifen Kapseln (Abb. 69) sind kugel- oder eiförmig und blassgrün. Etwa 25 Tage nach der Befruchtung erreichen sie ihre maximale Größe und sind etwa 30 Tage später reif. Reife Früchte sind dickwandig und lederig. Sie trocknen schnell und werden dabei bräunlich und runzelig. In diesem Stadium springen sie leicht auf und geben die behaarten Samen frei (Abb. 70). Unter normalen Bedingungen werden bis zu 60% der Knospen und unreifen Kapseln vorzeitig abgeworfen. Der Anteil, der die Fruchtreife erreicht, ist stark vom Wasser- und Nährstoffgehalt des Bodens abhängig. Der Name „Baumwolle“ leitet sich von den Büscheln langer Fasern in den Früchten der Baumwollpflanze ab, welche die Ausbreitung der Pflanzensamen über größere Distanzen ermöglichen. Die Haare der Baumwollsamensamen werden von Epidermiszellen der Samenschale gebildet. Viele Pflanzensamen tragen Samenhaare, doch nur die der Baumwollpflanze werden zur Textilherstellung verwendet.

In der Textilindustrie und -verarbeitung unterscheidet man die Baumwolle primär nach ihrer Stapellänge (Faserlänge). Je länger eine Baumwollfaser ist, um so hochwertiger wird sie eingestuft. Die Längengrade werden



Abb. 69. Unreife Baumwollkapsel (Cotton Insect Corner; [CIC. 2015](#)).



Abb. 70. Reife aufgesprungene Baumwollkapsel (Cotton Insect Corner; [CIC. 2015](#)).



Abb. 71. *Helicoverpa armigera*, Schmetterling (EPPO Global Database; [EPPO. 2015](#)).



Abb. 72. *Helicoverpa armigera*, Raupe (EPPO Global Database; [EPPO. 2015](#)).

in der Regel nach drei bis vier Kategorien sortiert, die so auch im Handel zu finden sind. Standard bildet die Upland-Baumwolle aus den USA mit einer Faserlänge von ca. 20 – 25 mm. Fasern mit weniger als 10 mm Stapellänge sind für die Textilverarbeitung nicht geeignet. Vor der maschinellen Enthaarung trägt der Samen zwei Haartypen, lange Lint-Fasern, die zur Herstellung von Textilien dienen und kurze Fusseln (Linters), die in verschiedenen Produkten, darunter auch Lebensmitteln, zur Verwendung kommen. Die Fusseln entfernt man nach dem maschinellen Enthaarungsschritt durch eine Säurebehandlung. Die zurückbleibenden nackten Samen sind oval, ca. 10 mm lang und 4 mm dick und dunkelbraun. Jede Baumwollkapsel enthält ca. 20 - 25 Samen. Die Samen der Baumwollpflanze sind giftig, sie enthalten bis zu 1,5 % Gossypol.

7.1.2 Systematik und Phylogenie

Baumwolle gehört zur Gattung *Gossypium* (Familie Malvengewächse (*Malvaceae*), Ordnung Malvenartige (*Malvales*), Klasse *Dicotyledoneae* (Zweikeimblättrige Bedecktsamer)). Die Gattung *Gossypium* hat 49 Arten, von denen 4 kultiviert werden. Es sind dies die beiden Altweltarten *G. herbaceum* und *G. arboreum* sowie die beiden Neuweltarten *G. hirsutum* und *G. barbadense*. Der Ursprungsort der Gattung *Gossypium* ist unbekannt. Die Hauptursprungszentren, von denen die Diversität ihren Ausgang nahm, sind Mexiko (18 Arten), Nordostafrika und Arabien (14 Arten) und Australien (17 Arten). DNA-Sequenzvergleiche der rezenten *Gossypium*-Genome lassen vermuten, dass die Gattung vor ca. 10 - 20 Mio. Jahren entstand. Den größten Anteil an der kommerziell angebauten Baumwolle haben zwei Arten, *G. hirsutum* (Upland-Baumwolle, 90% des globalen Anbaus) und *G. barbadense* (Pima, langstapelige Baumwolle). In Asien werden auch *G. arboreum* und *G. herbaceum* kultiviert.

Die globale Evolution der Gattung *Gossypium* war von einer tiefgreifenden Veränderung der Genomgröße und Chromosomenstruktur begleitet. Die Gattung *Gossypium* enthält 44 diploide Arten mit 26 Chromosomen (2×13) und 5 allotetraploide (durch Hybridisierung zweier Diploider) entstandene Arten mit 52 Chromosomen. Aufgrund chromosomaler Ähnlichkeiten gliedert man die Baumwollarten in 8 diploide Genomtypen A - G und K und eine tetraploide Gruppe. Jedes Genom entspricht einer Gruppe morphologisch ähnlicher Arten, welche nur gelegentlich mit Arten anderer Gruppen Hybride bildet. Das A-Genom kommt nur bei den beiden diploiden Altweltarten *G. arboreum* und *G. herbaceum* vor, das D-Genom nur bei manchen diploiden Neuweltarten wie *G. thurberi*. Die agrarisch weitestgehend wichtigsten Arten sind *G. hirsutum* und *G. barbadense*. Beide sind Allotetraploide mit der Genomkonfiguration AADD. Man kennt weder ihre diploiden Ahnen noch den Zeitpunkt und Ort ihrer Hybridisierung. Vermutlich entstanden sie vor langer Zeit in der Neuen Welt durch Kreuzungen diploider Arten mit der Konstitution AA und DD. Sie haben 26 Chromosomenpaare ($2n = 52$).

7.1.3 Baumwollschädlinge und -krankheiten

7.1.3.1 Schädlinge

Mehr als 1326 Insektenarten sind in kommerziellen Baumwollkulturen gefunden worden, aber nur wenige von ihnen sind Schädlinge



Abb. 73. *Helicoverpa zea*, Schmetterling (Cotton Insect Corner; [CIC, 2015](#)).

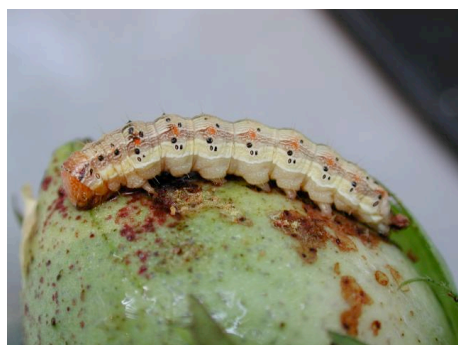


Abb. 74. *Helicoverpa zea*, Raupe (Cotton Insect Corner; [CIC, 2015](#)).



Abb. 75. *Helicoverpa zea*, Puppe (Cotton Insect Corner; [CIC, 2015](#)).



Abb. 76. Blattläuse an einem Baumwollblatt (Cotton Insect Corner; [CIC, 2015](#)).

([Matthews & Tunstall, 1994](#)). Von den rund 30 Schädlingen kultivierter *G.-hirsutum*-Baumwolle sind die gefährlichsten die Raupen der Baumwollkapselbohrer *Helicoverpa armigera* (Abb. 71, 72) und *Helicoverpa zea* (Abb. 73, 74) sowie die Spinnmilbe *Tetranychus urticae* ([Shaw 2000](#)). *Helicoverpa armigera*, der gemeine Baumwollkapselbohrer, ist eine Motte aus der Familie der Noctuiden. Sein Verbreitungsgebiet ist die gesamte australasiatische Pazifikregion, Afrika und Westeuropa. Er hat einen weiten Wirtsbereich, und seine Raupen attackieren viele Acker- und Gartenpflanzen. In den vergangenen 30 Jahren wurde der Schmetterling vorwiegend mit synthetischen Pestiziden bekämpft, was die Evolution einer weit verbreiteten Resistenz gegen viele dieser Chemikalien bewirkte. 80 bis 90% der Insekten sind inzwischen resistent gegenüber synthetischen Pyrethroiden. Die Motten legen ihre Eier an jungen Zweigspitzen ab, und die Larven schlüpfen innerhalb von 2-3 Tagen. Die Raupen attackieren junge Blätter und Blütenknospen, bohren sich in diese ein und ernähren sich dann von den sich entwickelnden Früchten, Samen und Fasern. Das Raupenstadium dauert 15 - 20 Tage, und so kann *H. armigera* in einer Vegetationsperiode 4-5 Generationen durchlaufen. Die letzte Generation überwintert im Puppenstadium im Boden. Im folgenden Frühjahr schlüpfen die Motten und kommen an die Bodenoberfläche. Mechanische Bodenbearbeitung am Ende der Baumwollsaison zerstört die Tunnelausgänge, welche die Larven anlegen, wenn sie sich in den Boden eingraben. 80 - 90% der Nachkommen können so vernichtet werden. So lässt sich die Entwicklung resistenter Populationen im kommenden Frühjahr stark verzögern. *Helicoverpa zea* (Abb. 73, 74, 75) ähnelt *H. armigera* und kommt in Nord- und Südamerika vor. Ein weiterer naher Verwandter ist *H. punctigera*. Auch dieser Schmetterling spielt als Baumwollschädling eine Rolle, kommt aber nur in Australien vor. Spinnmilben sind ebenfalls verbreitete Baumwollschädlinge. Am häufigsten ist *Tetranychus urticae*. Spinnmilben leben auf der Unterseite der Blätter, die dann verbräunen oder rötlich werden und schließlich vertrocknen. Wirtschaftlich weniger ins Gewicht fallende Schädlinge sind Weichwanzen wie *Creontiades dilutes* (Familie *Miridae*), Blattläuse (Abb. 76) wie *Aphis gossypii* und die Baumwollweißfliege (*Bemisia tabaci*).

7.1.3.2 Baumwollkrankheiten

Baumwollkulturen können von Pilzen und Viren befallen werden, was zu empfindlichen Ertragseinbußen führen kann. Bei Eintritt kühlen feuchten Wetters nach der Aussaat wird der Keimling leicht von Pilzen der Gattung *Pythium* und *Rhizoctonia* befallen. Andere Pilze befallen die Wurzelspitzen und infizieren die Leitungsbahnen des Sprosssystems, wobei die Pflanzen welken. Die *Verticillium*-Welke ist in den meisten Anbaugebieten verbreitet. Der Pilz hat einen weiten Wirtsbereich und befällt auch viele Wildpflanzen. Man kennt konventionelle Baumwollsorten, die eine mehr oder weniger ausgeprägte Resistenz gegenüber diesen Krankheiten besitzen. Kommerziell nutzbare Biotechsorten mit transgenen Krankheitsresistenzen sind bisher nicht erhältlich.

7.2 Baumwollproduktion

7.2.1 Geschichte

Baumwolle wird seit Jahrtausenden zur Herstellung von Textilien verwendet. In Indien wurde Baumwolle bereits von den Bewohnern der Induszivilisation kultiviert, einer der frühesten städtischen Zivilisationen, die sich etwa zwischen 2800 und 1800 v. Chr. entlang des Indus im Nordwesten des indischen Subkontinents entwickelte. Aus Indien gelangten Baumwolltextilien bereits in vorchristlicher Zeit in den Mittelmeerraum. Arabische Händler brachten Baumwollwaren im 1. Jh. n. Chr. nach Italien und Spanien. Im 9. Jh. begannen die Mauren in Spanien Baumwolle zu kultivieren. Mit der Ausweitung des Fernhandels in der frühen Neuzeit verdrängte die Baumwolle auch in Nord- und Mitteleuropa zunehmend Leinen (Flachs) und Hanf für die meisten Anwendungsbereiche. Die ältesten Baumwollkulturen der Neuen Welt fand man in Mexiko, wo ca. 3000 v. Chr. die einheimische Art *G. hirsutum* kultiviert wurde. Auf diese Art entfallen heute ca. 90% der Baumwollweltproduktion. In Südamerika bildete die einheimische Art *G. barbadense* das Rückgrat präkolumbianischer peruanischer Küstenkulturen.

In Europa bewirkte die in Großbritannien beginnende industrielle Revolution um die Mitte des 18. Jh. einen enormen Aufschwung der Baumwollindustrie, und Textilien wurden in den folgenden Jahrzehnten zum führenden britischen Exportartikel. Rohbaumwolle wurde ursprünglich aus Indien importiert; jedoch konnten die britischen Baumwollspinnereien um 1840 ihren Rohstoffbedarf mit indischer Baumwolle nicht mehr decken. Dieser wurde nun mehr und mehr mit amerikanischer und karibischer Baumwolle befriedigt, die infolge der Sklaverei nicht nur wesentlich billiger sondern auch besser war, da die beiden Neuweltarten *G. hirsutum* und *G. barbadense* längere und stärkere Fasern als indische Baumwolle haben. Mit der Ausdehnung des Baumwollanbaus im Süden der Vereinigten Staaten erreichte die Sklaverei in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts ein größeres Ausmaß als jemals zuvor. Vom Ende des 18. bis ins 20. Jahrhundert hinein bildete Baumwolle das wichtigste Exportgut des amerikanischen Südens. Ein großer Teil der Baumwollweltproduktion entfällt heute auf die langfaserige amerikanische Qualität.

In Australien begann der Baumwollanbau zur Zeit des Amerikanischen Bürgerkriegs (1861-65), der eine Verknappung der Baumwollausfuhren bewirkte. Die Etablierung einer gegenüber Ernteaussfällen stabilen Baumwollproduktion dauerte in Australien bis in die Mitte des vergangenen Jahrhunderts.

7.2.2 Anbau

7.2.2.1 Aussaat und Keimung

Niedrige Temperaturen und geringe Bodenfeuchtigkeit bewirken beim Baumwollsaamen den Eintritt der Samenruhe (Dormanz). Außerdem bilden manche Varietäten harte Samen, die beim Trocknen wasserundurchlässig werden und dann nur langsam keimen. Diese "induzierte Dormanz" findet man auch bei vielen Gemüsen. Das Merkmal ist agronomisch unerwünscht und ist durch Züchtung und Selektion weitgehend bei den modernen Kultivaren eliminiert worden. Auch unmittelbar nach der Fruchtreifung gesammelte Baumwollsaamen können eine native Dormanz besitzen, die den Samen an der Keimung hindert, selbst dann, wenn die Keimungsbedingungen günstig sind. Diese genetisch bedingte native Dormanz kann bei bestimmten Sorten mehrere Monate betragen. Zur Verwendung als Saatgut wird der enthaarte Baumwollsaamen zunächst mit Säure behandelt, was die Keimfähigkeit begünstigt. Unter günstigen Bedingungen (Temperatur, Bodenfeuchtigkeit, Sauerstoffzutritt) beträgt die Keimungsrate nach der Aussaat mehr als 80%. Die Keimwurzel erscheint gewöhnlich 2-3 Tage nach der Quellung, und 5 - 10 Tage später kommt der Keimling an die Oberfläche.

7.2.2.2 Wachstum und Ernte

Als Staude ist Baumwolle von Natur aus mehrjährig. Als Kulturpflanze belässt man sie in der Regel nur für ein Jahr auf dem Feld, um den höchsten Ernteertrag zu erzielen. Nach der Ernte bzw. nach einer Frostperiode werden die Pflanzen dann meist zur Gründüngung in den Boden eingearbeitet. In brennstoffarmen Regionen dienen sie auch als Feuerholz. In der nördlichen Hemisphäre findet die Aussaat abhängig vom Standort zwischen Anfang Februar und Anfang Juni statt. Die Ernte erfolgt zwischen Oktober und Februar. Zwischen Aussaat und Ernte liegen rund acht bis neun Monate. Da die Baumwolle oft ungleichmäßig abreift, wird häufig mehrmals geerntet. Bis in die 50er Jahre wurden die Baumwollbällchen auf den Feldern von Hand gepflückt.

Erst dann gab es zuverlässige Erntemaschinen. Bei kleinen Anbauflächen und in weniger entwickelten Staaten erntet man Baumwolle auch heute noch mit der Hand. Vor allem in Afrika gibt es viele kleine Baumwollfarmer,

die ihre Felder manuell bestellen. Auf großen Anbauflächen wird Baumwolle maschinell geerntet, wobei entweder Pflück- oder Abreißmaschinen eingesetzt werden (Abb. 77). Erstere entfernen nur die Bällchen und lassen die Pflanzen unbeschädigt. Letztere entfernen die Kapseln vollständig. Sie kommen erst zum Einsatz, wenn die Pflanzen durch eingetretenen Frost oder chemische Entlaubungsmittel ihre Blätter verloren haben. Man

verwendet sie insbesondere zum Abernten der niedrig wachsenden windresistenten Sorten, die überwiegend in Texas angebaut werden.



Abb. 77. Maschinelle Baumwollernte mit Module Builder in Texas (Wikipedia).

7.2.2.3 Ansprüche an Klima und Boden

Baumwolle braucht eine lange frostfreie Periode, viel Sonne und ausreichende Niederschläge (600 - 1200 mm). Sie gedeiht gut auf mittelschweren Böden und ist bezüglich deren Nährstoffgehalt nicht sehr anspruchsvoll. Im allgemeinen findet man diese Gegebenheiten auf beiden Hemisphären in den subtropischen und tropischen Regionen mit saisonaler Trockenheit. Ein großer Teil der Baumwollproduktion entfällt auf Gegenden, wo nicht genug Regen fällt, was eine ausgedehnte künstliche Bewässerung notwendig macht. Dies begünstigt die Versteppung mit anschließender Wüstenbildung und hat in manchen Anbauregionen bereits zu

ausgedehnten Umweltschäden geführt. Besonders deutlich wird dies am Beispiel des Aralsees, der seit den späten 1960er Jahren stark an Wasser verloren hat, da große Wassermengen zu Bewässerungszwecken für den Baumwollanbau abgezweigt werden, was zu einer weitreichenden Versalzung führte.

Die lange Wachstumszeit der Baumwolle erfordert nach der Ernte eine rasche Feldbestellung und Neuaussaat. Daher ist der Anbau von Zwischenfrüchten zur Verbesserung der Bodenqualität und zur Unterdrückung von Unkräutern kaum möglich. Besonders auf großen Flächen wird Baumwolle oft ohne Fruchtwechsel mit anderen Nutzpflanzen angebaut. Infolge dieser Monokulturen ist die großflächige Baumwollproduktion stark von Pflanzenschutzmitteln abhängig. Baumwolle gilt als das landwirtschaftliche Produkt mit dem höchsten Einsatz an Chemikalien. Auf Baumwolle entfallen etwa 25 % des weltweiten Insektizid- und 10 % des Pestizidmarktes.

7.2.3 Weltproduktion

Baumwolle ist mit einer Weltjahresproduktion im Wert von 500 Mrd. USD die wichtigste Textilfaser. 150 Länder ex- oder importieren Baumwollfasern. Die globale Nachfrage nach Baumwolle ist auf Dauer kaum zu erfüllen, weil die Bevölkerung wächst und gleichzeitig die nutzbaren Ackerflächen schrumpfen. Baumwolle wird heute auf allen fünf Kontinenten angebaut. Der größte Teil der Ernte stammt von den maschinell bewirtschafteten Monokulturen der großen Baumwollproduzenten. Den kleinflächigen manuellen Anbau von Baumwolle findet man in vielen Entwicklungsländern. Er ist dort noch ein wesentlicher Bestandteil der jeweiligen Volkswirtschaften. Weltweit leben 100 Mio. Familien ganz oder überwiegend von der Baumwollproduktion. Das Potential der konventionellen Baumwollzüchtung ist begrenzt. In der Gattung *Gossypium* kennt man nur wenige Merkmale, die für eine Einkreuzung in Kulturbaumwolle infrage kommen. Zudem wird dies durch die lange Vegetationszeit und die bei *Gossypium*-Arten verbreitete Allopolyploidie erschwert. Der größte Teil der angebauten Baumwollsorten ist transgen, auch in den Entwicklungs- und Schwellenländern. Neben insektenresistenten Bt-Baumwollsorten gibt es glyphosattolerante Biotechvarietäten. In Indien wurden 2006 42% der Anbauflächen mit Biotechsorten bebaut. Indien verfügt damit weltweit über das größte Areal an Biotechbaumwolle. 2011 waren 82% der weltweit bestellten Baumwollfelder transgen. Hauptmotiv für die schnelle Akzeptanz der Biotechsorten sind die damit erzielten Einkommensverbesserungen der Bauern und die Verringerung des zur Bekämpfung des Baumwollkapselbohrers und verwandter Schädlinge notwendigen Insektizidmengen. Die weltweit bedeutendsten Baumwollproduzenten sind die Volksrepublik China, Indien, USA und Pakistan. In Europa ist Griechenland das einzige Land mit einer nennenswerten Produktion. 2013 wurden weltweit insgesamt 24 Mt Baumwolle produziert (Tab. 21). Wie bei anderen Agrarprodukten ist der globale Baumwollmarkt stark reguliert. So erhalten die 25'000 Baumwollfarmer der amerikanischen Südstaaten jährlich ca. 2 Mrd. \$ an Subventionen.

7.2.4 Verwertung der Ernte

7.2.4.1 Fasern

Bei der Verarbeitung der Rohbaumwolle müssen die Samenhaare von den Samenkapseln entfernt werden. In einem ersten Arbeitsgang entfernt man dabei zunächst die langen Fasern, die dann zu Garnen versponnen und zu Textilien verarbeitet werden. Auf der Oberfläche bleibt ein Besatz kurzer Haare zurück. Sie werden in einem zweiten Arbeitsgang entfernt und dienen als Rohmaterial für Polsterungen und für Zellulose, die in der chemischen und lebensmittelchemischen Industrie vielfältige Verwendung findet. Bei der Aufarbeitung der Baumwolle gehen nur rund 10% des Rohgewichtes verloren. Wenn die Wachs-, Eiweiß- und weiteren Pflanzenreste entfernt sind, bleibt ein natürliches Polymer zurück, das zu 99,8% aus Zellulose besteht. Jede

Faser besteht aus 20 – 30 Lagen Zellulose in einer gedrehten Struktur. Die besondere Anordnung der Zellulose gibt der Baumwolle eine hohe Reißfestigkeit. Verglichen mit Kunstfasern ist Baumwolle sehr saugfähig und kann bis zu 80% ihres Gewichts an Wasser aufnehmen. Baumwollstoffe gelten als sehr hautfreundlich - sie „kratzen“ nicht - und haben, da sie frei sind von Nukleinsäuren und Proteinen, ein äußerst geringes Allergiepotential. Deshalb verwendet man Baumwollfasern in der Medizin als Verbandmaterial und in vielen Kosmetik- und Hygieneartikeln. Fischernetze, Seile und Taue bestehen häufig ganz oder teilweise aus Baumwollfasern, ebenso Zelte, Planen und Persennings. Baumwolle verwendet man ferner zur Herstellung mancher Papiersorten, von Kaffee- filtern und Bucheinbänden.

Rang	Land	Menge (Mt)	Anteil (%)
1	China	6,29	25,63
2	Indien	6,05	24,65
3	USA	2,84	11,57
4	Pakistan	2,17	8,84
5	Brasilien	1,12	4,56
6	Usbekistan	1,09	4,44
7	Türkei	0,83	3,38
	Sonstige	4,15	16,91
	Welt	24,54	100

Tab. 21. Die weltweit größten Baumwollproduzenten (FAOSTAT, 2016)

7.2.4.2 Samen

Baumwollsamensamen können, wenn sie in großen Mengen verzehrt werden, toxisch wirken, da sie unverträgliche oder giftige Substanzen wie Gossypol und Cyclopropenfettsäuren enthalten.

Nach Entfernung dieser Verbindungen können die Samen und ihr Besatz an kurzen Samenhaaren zu Speiseöl und Zelluloseprodukten verarbeitet werden, die in Lebensmitteln verwendbar sind. Der nach dem Auspressen des Öls verbleibende Ölkuchen ist als Proteinquelle nutzbar, falls das Gossypol vorher entfernt wird. In Zentralamerika und Indien ist der Verzehr von Baumwollsamensamenmehl üblich, da es eine hochwertige und sehr billige Proteinquelle darstellt. Als Zusatz zu Tierfutter können Baumwollsamensamen nur in begrenzten Mengen eingesetzt werden. Eine Ausnahme bilden erwachsene Wiederkäuer. Diese können die toxischen Verbindungen mithilfe ihrer mikrobiellen Pansenflora entgiften.

7.3 Biotechbaumwolle

7.3.1 Monotransgene Sorten

Die gegenwärtig zugelassenen 20 Biotechbaumwollkultivare ([CERA 2015](#)) sind ohne Ausnahme herbizid- und/oder insektenresistente *Gossypium-hirsutum*-Varietäten. Von den herbizidresistenten Sorten sind 8 glyphosatresistent, 3 sind glufosinatresistent, 2 sind bromoxynilresistent und eine ist resistent gegen Sulfonylharnstoffherbizide. 14 sind insektenresistent und tragen Gene gegen verschiedene Bt-Toxine. 8 Vertreter sind doppelt resistente Stapelsorten. Diese tragen mindestens zwei verschiedene Funktionsgene und sind sowohl insekten- als auch herbizidresistent. Man erhielt sie mit Ausnahme einer bromoxyniltoleranten Sorte auf konventionellem Wege durch Kreuzung monotransgener herbizid- bzw. insektenresistenter Elternpflanzen.

7.3.1.1 Bollgard (MON-531)

Zulassung

Im Jahre 1995 wurde in den USA unter dem Handelsnamen Bollgard die erste insektenresistente Biotechbaumwolle zugelassen. Bald folgten Zulassungen in zahlreichen weiteren Ländern. Der kommerzielle Anbau begann im Folgejahr. Da sich Produktionskosten und benötigte Insektizidmengen mit der neuen Sorte deutlich reduzieren ließen, wurde sie von den Baumwollfarmern recht schnell akzeptiert und begann den konventionellen Baumwollanbau zu verdrängen. 2001 wuchs Bollgard-Baumwolle auf mehr als 1/3 der amerikanischen Baumwollkulturfläche. Bollgard bot partiellen Schutz gegen die Baumwollkapselbohrer (*Helicoverpa zea* und *Helicoverpa armigera*) und nahezu vollständigen Schutz gegen zwei weitere Schadschmetterlinge aus der Familie der *Noctuidae*, *Heliothis virescens* und *Pectinophora gossypiella*. In asiatischen Schwellenländern, z. B. in Indien, wird Bollgard noch angebaut. Weltweit ist sie durch Bollgard II und weitere verbesserte Nachfolger fast vollständig ersetzt.

Molekulargenetik

Die ersten transgenen Bollgard-Baumwolllinien entstanden durch agrolistische Transformation einer konventionellen *Gossypium-hirsutum*-Kultursorte (Coker C312) mit einem Vektorplasmid, welches drei Genkassetten trug. Die erste enthielt einen verbesserten CaMV35S-Promoter, die für die Expression in Pflanzen optimierte Sequenz des CryAc-Toxins von *Bacillus thuringiensis* und den Transkriptionsterminator des Gens der α -Untereinheit des β -Conglycinins der Sojabohne. Die Sequenz des von den Pflanzen produzierten Cry2Ac-Proteins stimmt zu 99,4% mit dem des natürlichen Toxins überein. β -Conglycinin ist ein Speicherprotein des Sojasamens. Die zweite Genkassette bestand aus einem CaMV35S-Promoter mit nachgeschaltetem Neomycinphosphotransferase-Gen (*nptII*). Die dritte Expressionskassette bestand aus einem von bakteriellen Expressionssignalen flankierten Antibiotikaresistenzgen (*aad*), welches eine bakterielle Aminoglykosidtransferase (AAD) kodiert. AAD verleiht Streptomycin- und Spectinomycinresistenz.

Nach DNA-Gelblotanalysen trägt das Genom von MON531 zwei direkt hintereinander liegende Kopien der *cry2Ac*-Sequenz, von denen eine vollständig und funktionsfähig ist. Die zweite enthält nur die Endregion des Gens. Die beiden Insertionen sind eng gekoppelt und segregieren bei Kreuzungsexperimenten wie ein einzelner stabiler Mendelfaktor. Das CryAc-Protein wird in den Bollgard-Pflanzen nur in geringen Mengen gebildet. In Blättern findet man im Mittel ca. 1,5 μ g Toxin/g Frischgewebe, in den Samen deutlich weniger. Die geringe Toxinkonzentration genügt offenbar, um die Entwicklung der Schmetterlingsraupen wirksam zu hemmen. Die Toxinkonzentration ist nicht in allen Pflanzen gleich und kann im Laufe der Wachstumsperiode um rund das 3fache variieren. Auch das NP-II-Protein ist in der Pflanze nachweisbar. In Blättern findet man ca. 3 μ g NPTII / g Frischgewebe. NPTII hat keinen Einfluss auf die agronomischen Eigenschaften. Das *aad*-Gen wird, da es von bakteriellen Expressionssignalen flankiert ist, in der Pflanze nicht exprimiert.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Bollgard bietet partiellen Schutz gegen die Baumwollkapselbohrer (*Helicoverpa zea*, *H. armigera*) und nahezu vollständigen Schutz gegen zwei weitere Schadschmetterlinge aus der Familie der *Noctuidae*, *Heliothis virescens* und *Pectinophora gossypiella*. In der frühen Wachstumsphase ist der Cry1Ac-Pegel im Pflanzengewebe so hoch, dass auf chemische Insektizide verzichtet werden kann. Mit zunehmendem Alter der Pflanzen nimmt der Cry1Ac-Pegel in den Pflanzen ab, so dass in der späten Saison Sprühungen mit Insektiziden erforderlich werden. Dennoch ist der Insektizidverbrauch auf Bollgard-Feldern wesentlich niedriger als auf konventionellen Feldern.

Abgesehen von der Anwesenheit der Transgene, ihrer Proteinprodukte und der Insektenresistenz sind Bollgard-Pflanzen von konventionellen Sorten nicht unterscheidbar. Die in den USA 1990-1994 durchgeführten Feldversuche und der darauf einsetzende großflächige kommerzielle Anbau haben keine Hinweise darauf geliefert, dass die agronomischen Eigenschaften durch die neuen Merkmale verschlechtert werden könnten. Auch ergaben sich bisher keine Anhaltspunkte für eine negative Beeinflussung des Ökosystems.

7.3.1.2 LLCotton25

Zulassung

LLCotton25 ist eine herbizidresistente Biotechbaumwolle der Firma Bayer CropScience. Die im Jahre 2003 und später in den USA und anderen Ländern für den kommerziellen Anbau zugelassene Sorte wurde entwickelt, um die Verwendung Phosphinothricin als Wirkstoff enthaltender Totalherbizide, insbesondere von Ammoniumglufosinat, zur Unkrautbekämpfung in Baumwollmonokulturen zu ermöglichen. LLCotton25 exprimiert nur ein Fremdgen, das *bar*-Gen des Bodenpilzes *Streptomyces hygroscopicus*. Das Produkt des *bar*-Gens, Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT), verwandelt L-Phosphinothricin durch Acetylierung in das ungiftige N-Acetyl-L-Glufosinat. Zum Wirkungsmechanismus von Phosphinothricin und PAT findet man beim Mais Einzelheiten ([3.2.1](#)).

Molekulargenetik

LLCotton25 entstand durch agrolistische Transformation von Gewebekulturen der *Gossypium-hirsutum*-Sorte Coker312. Der Binärvektor des zur Transformation verwendeten Agrobakterienstamms trägt auf seiner T-DNA eine Genkassette, die aus dem CaMV35S-Promoter, dem *bar*-Gen des Bodenpilzes *Streptomyces hygroscopicus* und dem Transkriptionsterminator des Nopalinsynthasegens (*nos*) von *A. tumefaciens* besteht. Transformierte Pflanzenzellen, welche das *bar*-Gen exprimieren und sein Genprodukt, Phosphinothricinacetyltransferase, synthetisieren, können auf ammoniumglufosinathaltigen Medien wachsen. So lassen sich transgene Pflanzen regenerieren, ohne dass ein weiterer Selektionsmarker erforderlich ist.

DNA-Gelblots und PCR-Analysen zeigen, dass die Transformanten und ihre Nachkommen nur eine einzelne Kopie der T-DNA des Vektors enthalten, innerhalb welcher sich die vollständige funktionsfähige *bar*-Sequenz befindet. Bei Weiterzucht der Sorte vererbt sich das neue Merkmal über mehrere Generation stabil nach den Mendelschen Regeln. Krankheitssymptome, die eventuell durch die ursprünglich aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und *Agrobacterium tumefaciens* isolierten Promoter- und Terminatorsequenzen der *bar*-Kassette verursacht werden könnten, beobachtet man hier ebenso wenig wie bei transgenem Mais, Raps oder anderen Biotechpflanzen, welche die Expressionssignale dieser Phytopathogene im Genom tragen.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

PAT wird wegen des nahezu gewebeunabhängigen (konstitutiven) Expressionsverhaltens des CaMV-Promoters in mehr oder weniger allen Pflanzenteilen exprimiert, allerdings nur in geringen Mengen. Im Mittel findet man in Blättern 60 µg/g Frischgewebe und im enthaarten Samen ca. 127 µg/g. Im Samenhülchen ist PAT ebenfalls nachweisbar. Im rohen ebenso wie im raffinierten Samenöl findet man allenfalls noch Spuren. Wie in den Jahren 1999 - 2001 in den USA und Puerto Rico durchgeführte Feldversuche ergeben haben, ist LLCotton25 von den konventionellen Kultivaren nach Inhaltsstoffen, Ertrag, Bodenansprüchen, Krankheitsanfälligkeit und anderen agronomischen Merkmalen nicht unterscheidbar, mit Ausnahme der Glufosinatresistenz. Feldversuche lieferten auch keine Anhaltspunkte für von der Sorte ausgehende Umwelt- oder Gesundheitsrisiken.

7.3.2 Oligotransgene Sorten

7.3.2.1 Bollgard II (MON-15985-7)

Zulassung

Bollgard II ist ein verbesserter Nachfolger der Bollgard-Baumwolle, die 2002 in den USA und im gleichen Jahr in Australien und dann in zahlreichen weiteren Ländern zum Anbau zugelassen wurde. Die Sorte exprimiert im Unterschied zu Bollgard zwei verschiedene Bt-Toxine mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum. Dies resultiert in einem verbesserten Schutz vor dem Befall durch den Baumwollkapselbohrer und der Erweiterung der Resistenz auf einige Schädlinge, gegen die Bollgard empfindlich ist. Die Bollgard-Baumwolle wurde deshalb bald durch Bollgard II ersetzt. In Australien erreichte der Bollgard-II-Anbau bereits in der Saison 2004/2005 80% der gesamten Baumwollanbaufläche ([Downes u. a., 2007](#)).

Molekulargenetik

Bollgard II ist aus der Hybride DP50B entwickelt worden, einer Kreuzung zwischen der konventionellen Baumwollsorte DP50 und der transgenen Bollgard-Baumwolle MON-531. Sie trägt die 3 Transgene *cry1Ac*, *neo* und *aad*, der Bollgard-Baumwolle. Gewebekulturen der DP50B-Hybride wurden mit Plasmid-DNA biolistisch transformiert, welche 2 Genkassetten trug. Die Funktionselemente der ersten bestanden aus einem optimierten CaMV35S-Promoter, der Signalsequenz eines Chloroplastentransitpeptids des 5-Enol-Pyruvylshikimat-3-Phosphatsynthasogens (EPSPS) von *Arabidopsis thaliana*, der kodierenden Sequenz des *cryAb*-Gens und dem Transkriptionsterminator des *neo*-Gens von *Agrobacterium tumefaciens*. Die Cry2Ab-Sequenz ist zu 97% mit derjenigen des nativen Bt-Toxins identisch. Einige Codonen der Gensequenz wurden ausgetauscht, um eine optimale Expression in Pflanzen zu erreichen. Die zweite Genkassette trug das von den bereits beim *cry2Ab*-Gen verwendeten Expressionssignalen flankierte *uidA*-Gen von *E. coli*. Sein Produkt ist β -Glucuronidase. Damit trägt das Bollgard-II-Genom 5 artfremde Gene: *cry1Ac*, *cry2Ab*, *neo*, *aad* und *uidA*.

Nach molekularbiologischen und Kreuzungsanalysen trägt Bollgard II je eine Kopie des *cry2Ab*- und *uidA*-Gens, welche sich nach den Mendelschen Regeln stabil auf die Nachkommen vererben. Je nach untersuchtem Gewebetyp findet man in den Pflanzen unterschiedliche Konzentrationen des Cry2Ab-Toxins. Im Samen liegen sie bei 43 $\mu\text{g/g}$ Gewebe, in Blättern bei 24 $\mu\text{g/g}$. Sie sind damit wesentlich höher als die Cry1Ac-Konzentrationen. Während die Cry2Ac-Konzentration im Pflanzengewebe mit dem Alter der Pflanzen abnimmt, ist die Konzentration von Cry1Ab während der ganzen Anbausaison konstant.

Ertrags- und Qualitätsmerkmale

Wie die übrigen Bt-Toxine wirkt Cry1Ab durch Bindung an spezifische Rezeptormoleküle an der Oberfläche des Mitteldarmepithels der Zielinsekten. Nach der Bindung werden kationenspezifische Kanäle gebildet, was das Ionengleichgewicht im Mitteldarm zerstört. Dies führt zur Paralyse des Mitteldarms und schließlich zum Tod durch bakterielle Sepsis. Wie Cry1Ac ist auch Cry2Ab hochselektiv und wirkt nur gegen Schmetterlinge. Die beiden Toxine wechselwirken mit verschiedenen Bindungsstellen der Rezeptormoleküle, weshalb man davon ausging, dass die „Stapelung“ ihrer Gene in einer Pflanze den Resistenzbereich erweitern sollte. Tatsächlich ist dies auch der Fall. Insgesamt ist das Resistenzniveau von Bollgard II etwa 4mal höher als bei Bollgard. Die Sorte ist insbesondere gegenüber dem Baumwollkapselbohrer wesentlich widerstandsfähiger und zeigt auch verbesserte Resistenz gegen weitere Schadschmetterlinge aus der Familie der *Noctuidae*, gegen die Bollgard nur begrenzten Schutz bieten kann. Dazu gehören *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* und *Pseudoplusia includens*. Die übrigen agronomischen Eigenschaften der Sorte verändern sich durch die beiden neuen Gene, *cry2Ac* und *uidA*, nicht.

7.3.2.2 LLCotton25 x MON15985

Zulassung

LLCotton25 x MON15985 (Bayer CropScience) ist das Produkt einer klassischen Kreuzung der glufosinat-resistenten Sorte LLCotton25 und der insektenresistenten Bollgard-II-Baumwolle. Sie vereinigt die Merkmale beider Linien und ist glufosinat- und insektenresistent. Durch Kreuzung bereits zugelassener transgener Kultursorten gewonnene Hybriden bergen prinzipiell keine neuen Risiken und unterliegen deshalb nicht automatisch allen Sicherheitsprüfungen, welche zur Zulassung mit den Mitteln der DNA-Rekombination und Transformation entwickelter Linien erforderlich sind. Manche Länder, z. B. Japan und die Philippinen, verlangen auch in diesen Fällen formelle Genehmigungsverfahren. In Japan wurde die Sorte 2006/7 nach entsprechender Prüfung für Anbau und Verwertung freigegeben.

Eigenschaften der Hybriden

Im Genom der Sorte findet man 6 Transgene (Tab. 22.) Das *bar*-Gen stammt von der Elternsorte LLCotton25, die übrigen von MON15985. Mit Ausnahme des *aad*-Gens werden alle Transgene in den Hybriden exprimiert. Jedoch sind die Genprodukte von *neo* und *uidA*, Neomycinphosphotransferase und β -Glucuronidase, bei den Hybriden ebenso wie bei ihrem Elter ohne Einfluss auf die agronomischen Eigenschaften.

In allen untersuchten Geweben entspricht der Expressionspegel der 3 Funktionsproteine (PAT, Cry1Ac, Cry2Ab) demjenigen des jeweiligen Elters. Auch ist das Niveau der Insekten- bzw. Glufosinatresistenz bei den Hybriden ebenso hoch wie bei ihren Eltern. Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung der Transgene und ihrer Genprodukte fanden sich nicht. Ebensowenig fand man in den Hybriden neue, bei den Eltern nicht nachweisbare

Inhaltsstoffe. Der Phänotyp der Hybriden entsteht demnach durch die einfache additive Überlagerung der Elternmerkmale.

Die Einführung von Transgenen in konventionelle oder bereits transgene Sorten durch Einkreuzen bedeutet eine wesentliche Vereinfachung des Züchtungsprozesses. Es entfällt die Notwendigkeit, eine Sorte mehrfach transformieren zu müssen. Wenn die Elternpflanzen bereits zugelassen und Wechselwirkungen der neu kombinierten Merkmale in den Hybriden unwahrscheinlich sind, vereinfacht sich das Zulassungsverfahren, da die Kombination mehrerer Transgene in einer Pflanze unter diesen Umständen keine neuen Risiken birgt. Rund die Hälfte der gegenwärtig zugelassenen Biotechbaumwollkultivare sind Hybriden, die durch klassische Kreuzungen erhalten wurden.

Transgen	Genprodukt	Merkmal	Herkunft
<i>bar</i>	Phosphinothricin-N-Acetyltransferase	Glufosinatresistenz	LLCotton25
<i>cry1Ac</i>	Cry1Ac- δ -Endotoxin	Insektenresistenz	Bollgard II
<i>cry2Ab</i>	Cry2Ab- δ -Endotoxin	Insektenresistenz	"
<i>aad</i>	O-Aminoglykosid-Adenyltransferase	nicht exprimiert	"
<i>neo</i>	Neomycinphosphotransferase	Kanamycinresistenz	"
<i>uidA</i>	β -Glucuronidase	Farbmarker	"
Tab. 22. Transgene und Genprodukte der Stapelsorte LLCotton25 x MON15985 (CERA, 2015).			

7.3.3 Weitere Beispiele

Neben den 3 beschriebenen Biotechbaumwollsorten gibt es noch zahlreiche weitere. Tab. 23 zeigt eine Auswahl. Durchweg handelt es sich um insekten- und/oder herbizidresistente Sorten. Wie man sieht, gibt es einen deutlichen Trend zur Entwicklung von Sorten, welche zwei oder mehrere „gestapelte“ Transgene tragen. Man erhält sie überwiegend durch konventionelle Züchtung, indem man bereits transgene Sorten miteinander kreuzt und Genotypen selektiert, welche die Transgene ihrer Eltern übernommen haben.

Sorte	Jahr	Hersteller	Verfahren	Transgene	Eigenschaften
DD-01951A-7	1996	DuPont	Agrolistik	<i>als</i>	toleriert Sulfonyl-harnstoffherbizide
31807/31808	1997	Calgene	Agrolistik	<i>bxn</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>neo</i>	Insektenresistenz, toleriert Oxynil-herbizide
COT102	2005	Syngenta	Agrolistik	<i>vip3A(a)</i> , <i>aph4</i>	Insektenresistenz
DAS-21023-5 x DAS-24236-5	2004	Dow	konv. Züchtung	<i>cry1Ac</i> , <i>cry1F</i> , <i>pat</i>	Insektenresistenz
DAS-21023-5 x DAS-24236-5 x MON-01445-2	2006	Dow	konv. Züchtung	<i>CP4 epsps</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1F</i> , <i>pat</i> , <i>neo</i> , <i>aad</i>	Insekten- und Glyphosatresistenz
MON15985 x MON88913	2005	Monsanto	konv. Züchtung	<i>CP4 epsps</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry2Ab</i> , <i>aad</i> , <i>neo</i> , <i>uidA</i>	Insekten- und Glyphosatresistenz
Event-1	2006	JK Agri Genetics LTD, Indien	Biolistik	<i>cry1Ac</i>	Insektenresistenz

Tab. 23. Zum kommerziellen Anbau zugelassene Biotechbaumwollsorten. Die Gene in Spalte 5 kodieren folgende Proteine:

cry1Ac, *cry2Ab*, *cry1F*: δ -Endotoxine (*Bacillus thuringiensis*)

als: Acetolactatsynthase (*Nicotiana tabacum*)

bxn: Nitrilase (*Klebsiella pneumoniae*)

neo: Neomycinphosphotransferase (*E. coli*)

vip3A: vegetatives insektizides Protein (*Bacillus thuringiensis*)

aph4: Hygromycinphosphotransferase (*E. coli*)

pat: Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (*Streptomyces viridochromogenes*)

CP4 epsps: 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (*Agrobacterium tumefaciens* CP4)

uidA: β -Glucuronidase (*E. coli*)

Die Jahreszahlen in der zweiten Spalte beziehen sich auf das Jahr der erstmaligen Zulassung.

7.4 Prototypen

7.4.1 Erweiterung der Insektenresistenz

Die erste insektenresistente Baumwolle exprimierte das Cry1Ac-Toxin von *Bacillus thuringiensis* und kam 1995 in den USA auf den Markt. Seitdem hat sich der Anbau von Bt-Baumwolle als ein sehr wirksames und zudem umweltfreundliches Mittel erwiesen, um die Ausbreitung baumwollschädlicher Schmetterlinge zu begrenzen, kann aber auf Dauer nicht verhindern, dass die Schädlinge Resistenzen gegen Bt- δ -Endotoxine entwickeln. Beispiele resistenter Stämme gibt es inzwischen zur Genüge. Auch sind nicht alle Schmetterlinge gleich empfindlich gegen diese Gifte. Es werden seit geraumer Zeit mehrere Strategien kombiniert und im Feld erprobt, um die Resistenzentwicklung zu bekämpfen wie Einrichtung von Refugien, Genstapelung oder die Beschränkung der Transgenexpression auf bestimmte Organe, Wachstumsphasen oder einsetzenden Befall. Das größte Erfolgspotential hat vermutlich die Suche nach neuen Toxinen, mit denen das Repertoire der Schädlingsbekämpfung erweitert und die Resistenzentwicklung verzögert werden kann. Vip3A, das vegetative insektizide Protein 3A, ist ein im Baumwollanbau bisher nicht eingesetztes toxisches Bt-Protein. Im Gegensatz zu den kristallinen δ -Endotoxinen, welche das Bakterium während der Sporenbildung produziert, entsteht es in dessen vegetativer Wachstumsphase. Das Protein hat keine Sequenzhomologie zu den bekannten δ -Endotoxinen, und auch der Wirkungsmechanismus ist verschieden. Die Gefahr einer Kreuzreaktion mit den δ -Endotoxinen ist deshalb gering. Vip3A ist hochwirksam gegen die Eulenfalterarten *Agrotis ipsilon* (Ipsiloneule), *Spodoptera exigua* (Zuckerrübenmotte) und *Spodoptera frugiperda* (Spannermotte). Gegen verschiedene andere Insekten wirkt es ähnlich wie die δ -Endotoxine. Der Baumwollkapselbohrer (*Helicoverpa zea*) braucht aber 70mal mehr Vip3A als Cry1Ac und die Tabakmotte (*Heliothis virescens*), ebenfalls ein Baumwollschädling, 25mal mehr, damit die gleiche Wirkung erzielt wird. Soviel lässt sich auch mit starken Promotern wie dem CaMV35S-Promoter in transgenen Pflanzen nur schwer produzieren. Dies gelingt aber, wenn man die Toxingene mit Chloroplastentransportsequenzen koppelt, die bewirken, dass die Proteine in den Chloroplasten angehäuft werden. Als Signalsequenz eignet sich die Transitsequenz des TH11-Proteins, eines Thiazol-Enzyms von *Arabidopsis thaliana*. TH11 trägt am N-terminalen Ende der Peptidkette eine typische Chloroplastentransitsequenz, welcher eine mitochondriale Transportsequenz vorausgeht, was einen dualen Transport in Mitochondrien und Chloroplasten ermöglicht. Der größte Teil des Enzyms wandert in die Chloroplasten. Es sind synthetische, für die Expression in Baumwolle sequenzoptimierte Vip3A-Gene konzipiert, mit der TH11-Signalsequenz und dem CaMV35S-Promoter gekoppelt und agrolistisch in Baumwolle übertragen worden. Durch Verwendung der Chloroplastentransitsequenz kann die Vip3A-Konzentration in transgenen Baumwollblättern wesentlich gesteigert werden. Sie ist mindestens 3mal höher als bei Kontrollpflanzen, die Vip3A ohne Transitpeptid bilden. Der Befall mit *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* und *Helicoverpa zea* lässt sich damit vollständig unterdrücken. Im übrigen verändern sich die agronomischen Merkmale der neuen Linien durch die Expression des neuen Bt-Toxins und seine Akkumulierung in den Chloroplasten nicht. Es könnte deshalb in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung multiresistenter Bt-Baumwolle liefern ([Wu u. a., 2011](#)).

7.4.2 Stoffwechselmodifizierung

7.4.2.1 Entgiftung des Baumwollsamens durch Entfernung von Gossypol

Beim Abernten eines Baumwollfeldes fallen für jedes kg Fasern ca. 1,6 kg Samen an. Nach Tonnage gerechnet ist Baumwolle damit nach der Sojabohne die wichtigste Ölpflanze. Die Samen enthalten ca. 21% Öl und 23% relativ hochwertiges Protein, das aber wegen seines Gossypolgehalts als Nahrungs- oder Futtermittel wie bereits erwähnt nur eingeschränkt verwertbar ist. Gossypol ist ein Herz und Leber schädigendes Terpenoid. Wiederkäuer können begrenzte Gossypolmengen in der Nahrung tolerieren. Diese Tiere können aber ihre Nahrung nur mit begrenzter Wirksamkeit in Fleisch verwandeln. Geflügel und verschiedene Wassertiere (Garnelen, Lachse u. a.) sind bei dieser Konvertierung 3-5mal effizienter ([Palle u. a., 2013](#)). Letztere sind aber weitaus empfindlicher gegenüber Gossypol. Die Eliminierung des Gossypols aus den Baumwollsamens würde diese reichlich vorhandene und ernährungsphysiologisch hochwertige Nahrungsquelle für Nutztiere uneingeschränkt verwertbar machen. Theoretisch könnten 44 Mt Baumwollsaat, die weltweit jährlich geerntet werden und 9 Mt Protein enthalten, den Jahresproteinbedarf (50g/Tag) einer halben Milliarde Menschen decken. Gossypolfreier Baumwollsaat wäre deshalb auch ein sehr substantieller Beitrag zur Direktversorgung der weiter wachsenden Weltbevölkerung.

Der Besitz von Gossypol und verwandten Terpenoiden ist für die Gattung *Gossypium* typisch. Zusammen mit anderen Terpenoiden werden diese Substanzen in Drüsenzellen gebildet, welche sich über die ganze Pflanze verteilen. Durch mikrobielle Infektionen werden sie zusätzlich induziert und gewähren der Pflanze einen partiellen Schutz vor Pathogenen und Fraßschädlingen. Um 1954 entdeckte man eine drüsenlose Baumwollmutante und versuchte in mehreren Züchtungsprojekten das Merkmal in kommerzielle Sorten einzukreuzen, um gossypolfreie Baumwollsaamen zu bekommen. Unter Feldbedingungen erwiesen sich die gossypolfreien Sorten aber als extrem anfällig gegen Schädlingsbefall, weil ihnen die Schutz bietenden Terpenoide fehlten. Versuche, sie in den Baumwollanbau einzuführen, wurden deshalb aufgegeben.

Den einleitenden Schritt der Gossypolsynthese bildet die Synthese von (+)- δ -Cadinen aus Farnesyldiphosphat. Er wird durch δ -Cadinensynthase katalysiert. Mehrere weitere Enzymreaktionen liefern dann Gossypol und verwandte Sesquiterpenoide. In den Blättern und Samen drüsenloser Baumwollmutanten findet man keine δ -Cadinensynthaseaktivität, was die Unterbrechung der Cadinen-Terpenoidsynthese erklärt. Es lässt sich vermuten, dass sich die mit dem Enzymdefekt verbundene Krankheitsanfälligkeit der Pflanzen vermeiden lässt, wenn die Terpenoidsynthese nur im Samen unterbrochen wird und in den übrigen Organen normal verläuft. Zwei gentechnische Verfahren kommen dafür in Betracht: die Antisense-RNA-Technik und die RNA-Interferenz-technik (RNAi-Technik). Während die ältere Antisensetechnik zur gezielten Ausschaltung einzelner Gene schon länger gebräuchlich ist, gibt es für die erfolgreiche Anwendung der RNA-Interferenz bei Kulturpflanzen bisher nur wenige Beispiele. Bei der Baumwolle versuchte man zunächst, die Gossypolsynthese durch Transformation von Baumwollpflanzen mit Antisensekonstrukten der δ -Cadinensynthase zu blockieren, was auch gelang. Allerdings konnte man mit dieser Technik nur genetisch instabile Baumwolllinien erhalten, bei denen der Gossypolgehalt in der zweiten Folgegeneration (T_2) bereits wieder wesentlich höher lag als bei den primären Transformanten (T_0) ([Sunilkumar u. a., 2006](#)). Mithilfe der RNAi-Technik gelang die Etablierung über mindestens 5 Generationen genetisch stabiler Baumwolllinien, deren Samen praktisch kein Gossypol mehr enthalten ([Sunilkumar u. a., 2006](#); [Rathore u. a., 2012](#)). Als Triggersequenz diente ein 304 bp langes Stück aus der kodierenden Sequenz eines δ -Cadinogens von *Gossypium hirsutum*. Man entwickelt daraus ein hpRNA (hairpin RNA) -Konstrukt, das mit dem samenspezifischen Promoter eines α -Globulins von *Gossypium hirsutum* gekoppelt wurde. In den Samen mit dieser DNA agrolistisch transformierter Baumwollpflanzen ist der Gossypolgehalt um bis zu 99% reduziert. Im Mittel beträgt er in der zweiten Folgegeneration (T_2) der primären Transformanten (T_0) noch 0,19 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe (190 ppm). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erlaubt noch 0,6 μg (600 ppm) freies Gossypol pro mg bei für die Verwendung in Lebensmitteln bestimmten Baumwollsaatprodukten. Bei Kreuzungsversuchen vererbt sich der gossypolarmer Phänotyp zusammen mit dem für die Stilllegung der Cadinensynthase verantwortlichen Triggergen. Die Stilllegung ist strikt samenspezifisch, und die Pflanzen haben in den übrigen Organen einen normalen Gehalt an Gossypol und Terpenoiden. Bei Infektionsversuchen mit phytopathogenen Pilzen wie *Rizoctonia solani* und *Trichoderma virens* zeigen RNAi-Baumwollkeimlinge ebenso wie der Wildtyp eine starke Abwehrreaktion, die an einer starken Induktion der Gossypol- und Terpenoidsynthese in Hypokotyl und Wurzel erkennbar ist. Soweit es aus Gewächshausversuchen hervorgeht, erfüllen die neuen Linien damit wesentliche Voraussetzungen für den Einsatz im kommerziellen Baumwollanbau: Das neue Merkmal ist genetisch stabil. Seine Expression ist auf den Samen beschränkt. Die Pathogenabwehr ist deshalb nicht geschwächt wie bei den drüsenlosen Baumwollmutanten. Sie ist zudem durch den Kontakt mit Krankheitserregern induzierbar wie beim Wildtyp.

Erste im Umfang noch begrenzte Erfahrungen aus dem Feldanbau stammen aus in den Jahren 2009 - 2011 in den USA gemachten Feldversuchen. Der sehr niedrige Gossypolgehalt der Samen ist hiernach auch unter Feldbedingungen stabil und auf den Samen beschränkt. Das Sprosssystem zeigt den vom Wildtyp bekannten Gehalt an Gossypol und verwandten Terpenoiden. Der Gossypolgehalt der transgenen Samen liegt bei 150 - 450 ppm und ist damit 14 - 46 mal niedriger als beim Wildtyp. Außerdem haben die transgenen Samen einen um 4-8% höheren Ölgehalt. Im übrigen gleicht ihre biochemische Zusammensetzung derjenigen ihrer nicht transgenen Elternpflanzen. Die Faserqualität ist nicht beeinträchtigt, und dies gilt auch für die übrigen bisher bekannten Bonitätsmerkmale. Die mit der RNAi-Technik bewirkte embryospezifische Stilllegung des δ -Cadinogens wird so vermutlich zu marktfähiger Biotechbaumwolle führen, deren Samen vorerst als Tierfutter und später wahrscheinlich auch zur menschlichen Ernährung verwendet werden können ([Palle u. a., 2013](#)).

Neben der Baumwolle kennt man mehrere andere Kulturpflanzen, deren Wert als Nahrungsmittel durch den Gehalt an giftigen Verbindungen stark gemindert wird. Die Samen der Saatplatterbse (*Lathyrus sativus*), einer tropisch/subtropischen Gemüsepflanze, enthalten ein natürliches Nervengift, das β -N-oxalylamino-L-Alanin.

Der dauerhafte Genuss ihres Mehls verursacht bei der armen Bevölkerung vieler Länder Asiens und von Teilen Afrikas eine als Lathyrismus bekannte chronische Erkrankung des Nervensystems. Charakteristische Symptome sind Muskelkrämpfe und fortschreitende spastische Lähmung der unteren Beinmuskulatur. Cassava (Maniok) und Favabohnen enthalten cyanogene (Blausäure entwickelnde) Glykoside. Die gentechnische Entgiftung dieser Kulturpflanzen würde nicht nur die Lebensmittelsicherheit verbessern, sondern auch die Versorgung der wachsenden Weltbevölkerung, ohne dass Erträge oder Anbauflächen vergrößert werden müssten.

7.4.3 Verbesserung der Salz- und Trockentoleranz

7.4.3.1 Stimulierung des Ionentransports durch die Vakuolenmembran

Für die Steigerung der Weltagrarproduktion bilden die begrenzten Süßwasserreserven der Erde eines der größten Hindernisse. Die Züchtung trocken toleranter Sorten gehört deshalb zu den Hauptzielen der Kulturpflanzenzüchtung. Baumwolle gilt zwar gemeinhin als trocken tolerant, benötigt aber zu optimalem Wachstum eine gute Wasserversorgung, was in vielen Anbaugebieten künstliche Bewässerung notwendig macht. Trockenstress beeinträchtigt das Wachstum und mindert Ertrag und Faserqualität. Die Empfindlichkeit einer Pflanze gegenüber Trockenheit hängt wesentlich von der Konzentration der in den Vakuolen der Pflanzenzellen gelösten Ionen, Zuckern, Aminosäuren und anderen Metaboliten ab. Je höher diese ist, desto höher ist auch die osmotische Saugkraft der Zelle und damit ihre Fähigkeit, über die Wasserleitungsbahnen Wasser aus dem Boden aufzunehmen und so ihren Turgordruck auch bei niedrigem Wasserpotential der Bodenlösung aufrechtzuerhalten. Viele dieser Verbindungen werden aktiv, d. h. unter Energieverbrauch, von in der Vakuolenmembran verankerten molekularen Pumpen aus dem Zellplasma in die Vakuole gepumpt. Natrium- und Kaliumionen werden durch zwei Ionenpumpen im Austausch gegen Protonen in die Vakuole transportiert. Treibende Kraft dieses Gegenverkehrs (Antiports) ist ein quer zur Membran orientierter Protonengradient. Er wird durch in der Vakuolenmembran sitzende Protonenpumpen, eine ATPase und eine Pyrophosphatase, aufrechterhalten, welche Protonen aus dem Cytoplasma in die Vakuole pumpen. Die ATPase bezieht ihre Energie aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat, die Pyrophosphatase aus derjenigen von Pyrophosphat.

Die Überexpression einer ATPase (AVP1) der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) in transgener *Arabidopsis* verbessert die Trocken- und Salztoleranz der Pflanze. Der Effekt ist mit einer Erhöhung der Konzentration von Ionen und Metaboliten in der Vakuole korreliert. Auch die Überexpression von AtHNX1, eines vakuolären Na^+/H^+ -Antiporters von *Arabidopsis*, in Raps (4.7.2.2) und Baumwolle erhöht die Salzresistenz und führt in Gegenwart von 200 mM NaCl zu besserem Wachstum und stärkerer Faserbildung. Bei transgenen Baumwollpflanzen, welche eine vakuoläre Pyrophosphatase der mit *Arabidopsis* verwandten Salzkresse (*Thellungiella halophila*) exprimieren, ist die Trockenresistenz deutlich verbessert. Man erhält diese Pflanzen durch agrolistische Transformation konventioneller Baumwollkultivare mit einer Expressionskassette, welches aus dem CaMV-Promoter und der kodierenden Sequenz eines vakuolären Pyrophosphatasegens (*tsVP*) besteht. Im Gewächshaus beobachtet man unter Stressbedingungen einen wesentlich stärkeren Anstieg der Pyrophosphataseaktivität als beim Wildtyp. In den Vakuolen findet man einen höheren Gehalt an Zuckern, Aminosäuren und anderen osmotisch wirksamen Substanzen. Die Pflanzen haben einen höheren Chlorophyll- und Wassergehalt und geringere Membranschäden als der Wildtyp. Spross- und Wurzelsystem entwickeln sich deutlich besser, und die Trockenmasse vermehrt sich um 30% - 43%. Auch der Samenertrag ist um 40 - 50% höher als beim Wildtyp. Man vermutet, dass die transgene Pyrophosphatase eine höhere Triebkraft für die Ionenpumpen liefert und dadurch Salz- und Trockentoleranz verbessert werden. (Lv u. a., 2009).

7.4.3.2 Stimulierung der Abscisinsäuresynthese

Fortschritte gibt es auch bei Versuchen, die Salz- und Trockentoleranz von Kulturbaumwolle durch Stimulierung der Biosynthese von Abscisinsäure zu verbessern. Abscisinsäure (ABA) ist ein Stresshormon, welches unter Trockenbedingungen vermehrt gebildet wird und Schutzmechanismen auslöst, die es der Pflanze erleichtern, Trockenperioden zu überstehen. Transgene Modellpflanzen, die Enzyme der ABA-Biosynthese überexprimieren und letztere dadurch stimulieren, zeigen oft eine verstärkte Trockentoleranz. Der letzte Schritt der Abscisinsäuresynthese ist die Umwandlung von Abscisinsäurealdehyd in ABA durch Abscisinsäurealdehyd-oxidase. Sie benötigt Sulfurase als Kofaktor, ein Molybdän enthaltendes Protein, dessen Gen (*los5*) isoliert und in Modellpflanzen eingeführt wurde. Transgener Reis, der *los5* von *Arabidopsis thaliana* (*atlos5*) überexprimiert und ebensolcher transgener Tabak sind trocken toleranter als der Wildtyp. Gestützt auf diese Erkenntnisse wurde *atlos5* agrolistisch auch in Baumwolle übertragen, wobei transgene Linien erhalten wurden, welche die Sulfurase überexprimieren. Keimlinge und Jungpflanzen dieser Linien sind trocken toleranter als der Wildtyp. Sie

akkumulieren mehr Abscisinsäure und bilden größere Mengen durch Trockenstress induzierter Enzyme. Die Integrität der Zellmembranen ist verbessert und sie bilden bis zu 23% mehr Biomasse als der Wildtyp unter gleichen Bedingungen (Yue u. a. 2012). Die nachhaltigsten Erfolge bei der Züchtung trockenresistenter Baumwolle werden sich vermutlich erreichen lassen, wenn man mehrere Resistenzmechanismen kombiniert.

7.4.4 Steigerung von Baumwollertrag und Faserqualität

7.4.4.1 Überexpression von Phytochrom B

Phytochrome, Eigenschaften und Funktionen

Phytochrome sind eine Klasse weit verbreiteter Photorezeptorproteine, die in Pflanzen, Bakterien und Pilzen vorkommen. Sie messen das Verhältnis von hellrotem zu dunkelrotem Licht und steuern eine Vielzahl von Prozessen, darunter die Keimung, die Keimlingsentwicklung und die Blütenbildung. Phytochrome können in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen: die P_r -Form (red) besitzt ein Absorptionsmaximum bei 660 nm, die P_{fr} -Form (far red) bei 730 nm. Diese spektralen Eigenschaften werden sowohl durch den Chromophor, ein lineares, aus 4 Pyrrolringen A, B, C, D bestehendes Tetrapyrrol, als auch durch das umgebende Protein bestimmt. Bei Aufnahme eines hellroten Lichtquants führt der D-Ring eine Drehbewegung aus um die Doppelbindung zwischen Ring C und D. Die Ringdrehung zieht eine Konformationsänderung des gesamten Proteins nach sich, das dadurch von der physiologisch inaktiven P_r -Form in die aktive P_{fr} -Form übergeht. Dieser Vorgang wird durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht umgekehrt. Die biologischen Antworten werden durch das Konzentrationsverhältnis P_r/P_{fr} bestimmt. Die intrazelluläre Signaltransduktion ist weitgehend unbekannt. In Eukaryonten treten Phytochrome immer als Dimere auf. Bei diesen ist eine Translokation des Proteins in den Kern nachgewiesen, wo es Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren eingehen und dort die Genexpression beeinflussen kann. Es werden aber auch cytosolische Antworten generiert.

In *Arabidopsis* wurden bislang fünf Gene für Phytochrome gefunden. Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass die Phytochrome sich vor der Divergenz der Samenpflanzen in die zwei Hauptgruppen Phy A und Phy B aufgespalten haben, in die sich alle Phytochrome einordnen lassen. Phy A kommt fast ausschließlich in großen Mengen in dunkelgezogenen (etiolierten) Pflanzen vor, da seine P_{fr} -Form instabil ist und dessen eigene Gentranskription hemmt. Phy B kommt in unter normalen Lichtbedingungen gezogenen Pflanzen vor, sowie in kleinen Mengen in etiolierten Pflanzen. Die P_{fr} -Form von Phy B ist im Gegensatz zu Phy A stabil und wird konstitutiv exprimiert.

Expression des Arabidopsis-Phytochroms in Baumwolle

Die tiefgehenden morphogenetischen Wirkungen der Phytochrome haben vermuten lassen, dass Wachstum und Ertrag von Kulturpflanzen durch Beeinflussung der Phytochromexpression verbessert werden können. Die Auswirkungen einer Überexpression von Phy A und besonders Phy B wurden in *Arabidopsis*, Tomaten und Kartoffeln ausgiebig untersucht: Transgene Phy B überexprimierende Kartoffeln zeigen Halbverzweigung bei verringerter Apikaldominanz, haben kleinere aber zahlreichere und dickere Blätter und stärkere Pigmentierung infolge vermehrter Anthocyan synthese.

Der Ertrag von Baumwolle kann gesteigert werden, wenn man das Phy B von *Arabidopsis thaliana* in Baumwollpflanzen exprimiert. Die agrolistische Transformation von Baumwolle mit einer Phy-B-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* liefert genetisch stabile transgene Baumwollpflanzen mit erhöhtem Phy-B-Pegel und darauf zurückführbaren Veränderungen bei Wachstum und Ertrag. Die transgenen Pflanzen sind genetisch stabil; der Phy-B-Gehalt schwankt jedoch und ist in manchen Individuen viel höher als in anderen. Im Gewächshaus und im Freiland gezogene Pflanzen zeigen beim Vergleich mit dem Wildtyp deutliche morphologische und biochemische Differenzen. Die Photosyntheserate transgener Blätter ist etwa dreimal so hoch wie beim Wildtyp. Die Spaltöffnungen sind weiter geöffnet und die Transpiration ist höher. Die Pflanzen nehmen deshalb verstärkt Wasser und Nährsalze aus dem Boden auf. Die Transgeniker sind kleiner als der Wildtyp (-40%), haben aber dickere Blätter. Sie bilden mehr Biomasse (+33%) und liefern einen höheren Ertrag (+35%). Da der Chlorophyllabbau in den Blättern langsamer erfolgt als beim Wildtyp, können sie im Laufe ihres Lebens mehr CO₂ fixieren. Besonders in Gegenden mit langer Vegetationsperiode könnte der Anbau Phy B überexprimierender Baumwollsorten deshalb einen deutlichen Ertragszuwachs bewirken (Rao u. a., 2011).

7.4.4.2 Stimulierung der Auxinsynthese

Die meisten mit Fasern assoziierten agronomischen Merkmale der Baumwolle wie Faserausbeute, Faserlänge, Faserstärke und Faserquerschnitt sind von mehreren Genen beeinflusste quantitative Merkmale. Ertrag und Faserqualität sind gewöhnlich negativ korreliert. Beide Merkmale gleichzeitig durch konventionelle Züchtung verbessern zu wollen ist deshalb ein nahezu aussichtsloses Unterfangen. Zu den wichtigsten Qualitätseigenschaften der Baumwollfasern gehören Dicke und Reifungsgrad. Beide Merkmale werden gewöhnlich durch den Micronaire-Wert erfasst. Die Micronaire-Skala reicht von 2 bis 8, wobei 2 die feinsten und 8 die größten Fasern darstellt. In der Textilindustrie gelten Micronairewerte von 3,5 - 4,9 als wünschenswert. Fasern mit Micronaire > 5 gelten als grob. Sie liefern minderwertiges gröberes Garn mit weniger Fasern im Querschnitt und geringerer Reißfestigkeit. In den vergangenen Dekaden hat die konventionelle Züchtung viele ertragstarke Baumwollvarietäten hervorgebracht, hat aber auch unbeabsichtigt die Micronairewerte neuer Sorten erhöht. Werte über 5 sind deshalb zu einem Problem in der Baumwollindustrie geworden.

Baumwollfasern sind stark verlängerte Zellen, die von der Oberhaut (Epidermis) der Samenanlagen im Fruchtknoten der Baumwollblüte abgeleitet sind. Die Faserbildung ist charakteristisch für die Gattung *Gossypium*. Die Faserentwicklung verläuft in 4 gut definierten überlappenden Schritten: Initiierung, Verlängerung, Sekundärwandbildung und Reifung. Initiierung und Verlängerung haben großen Einfluss auf die Faserqualität. Die Faserentwicklung wird stark von Auxinen und andere Phytohormonen beeinflusst. Indol-3-Essigsäure (IAA), das wichtigste natürliche Auxin, ist notwendig für die Faserbildung. IAA-Anwendung *in vitro* fördert die Faserinitiierung und steigert die Zahl der Fasern. Unter Feldbedingungen kann die Faserbildung durch Behandlung der Blütenknospen mit IAA oder Gibberellinen gefördert werden, was aber im Produktionsmaßstab aus mehreren Gründen nicht machbar ist. Erste Versuche, die Faserbildung durch Überexpression an der Biosynthese der Indolessigsäure beteiligter Gene in transgener Baumwolle zu begünstigen, blieben ohne Erfolg, wurden aber zum Ausgangspunkt einer eingehenden Analyse der Rolle der Indolessigsäure bei der Initiierung der Faserbildung. Dabei zeigte sich, dass die Kinetik der IAA-Akkumulierung in den Epidermiszellen für die Auslösung der Faserbildung von entscheidender Bedeutung ist. Die IAA-Konzentration steigt in den Epidermiszellen kurz vor der Blütenöffnung (Anthese) stark an, erreicht um den Tag der Anthese ein Maximum und klingt in den folgenden Tagen langsam ab. An der Blütenentwicklung sind zahlreiche Gene beteiligt, die nach einem genetisch festgelegten Programm in verschiedenen Organen der Blüte raumzeitlich geordnet exprimiert werden. Manche werden nur in der Epidermis der Samenanlagen aktiv. Mehrere dieser Gene sind kloniert, in transgenen Modellpflanzen exprimiert und funktionell charakterisiert worden. Eines davon ist das Gen *fbp7* des floralen Bindungsproteins 7 (FBP7) der Petunie. Sein Promoter ist ein mittelstarker phasen-spezifischer Promoter, dessen Expressionsprofil gut mit der Induktionskinetik der IAA in den Epidermiszellen der Baumwollkapsel übereinstimmt. Man hat diesen Promoter mit einem aus der T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* stammenden Gen (*iaaM*) der IAA-Biosynthese gekoppelt und agrolistisch in Kulturbaumwolle übertragen, wodurch der IAA-Pegel in den Epidermiszellen stimuliert und die Faserbildung gefördert wird. Nach Selbstung der primären Transformanten erhielt man mehrere homozygote phänotypisch normale transgene Linien, von denen jede eine einzelne jeweils an einem anderen genetischen Locus inserierte *iaaM*-Kopie trug.

Misst man die Konzentration der mRNA dieses Gens in den Samenanlagen dieser Linien, so findet man in ihren Epidermiszellen am Tag der Blütenöffnung hohe Mengen des *iaaM*-Transkripts. Die Expression ist zeitabhängig. Am höchsten ist sie 2 Tage vor bis 5 Tage nach der Blütenöffnung. Dies ist das Zeitfenster, in dem sich ein Teil der Epidermiszellen zu Faserzellen differenziert. Später nimmt sie langsam und stetig ab. Die Konzentration der *iaaM*-mRNA ist deutlich mit derjenigen der Indolessigsäure korreliert, welche in den transgenen Pflanzen ca. 128% derjenigen des Wildtyps erreicht. Die Stimulierung der IAA-Synthese hat auch morphogenetische Wirkungen. Am Tag der Blütenöffnung ist die Zahl der Faserzellinitialen in der Epidermis der Samenanlagen dieser Linien um ca. 13 - 28% höher als beim Wildtyp. Sie bilden auch 20 - 40% mehr Fasern pro Samen als die Wildform. Der Gewichtsanteil der Fasern am Samen beträgt 45% gegenüber 37% beim Wildtyp und die Micronairewerte der Fasern sind mit 4,3 - 4,8 deutlich niedriger als bei den Kontrollen (6,1 - 6,3); d. h. die Fasern sind feiner. Das zeigt auch der mikroskopische Vergleich von Faserquerschnitten. Gleichzeitig mit der Vermehrung der Langfasern geht der Anteil der Kurzfasern auf der Kapseloberfläche, die in der Textilindustrie nicht verwertbar sind, zurück, und die Samen sind etwas kleiner als bei der Normalform. Dies zeigt, dass die Steigerung des Faserertrags nicht auf größere Samen zurückgeht, sondern auf eine Verschiebung der Samenmasse in Richtung der Langfaserbildung. Über mehrere Jahre in China durchgeführte Feldversuche

ergaben, dass der Faserertrag durch Einführung des neuen Gens um 14 - 24% gesteigert werden kann und dass diese Ertragssteigerung über mehrere Jahre stabil bleibt.

Neben dem *fbp7*-Promoter sind mehrere weitere samenspezifische Pflanzenpromoter mit IAA-Biosynthesegenen gekoppelt und in Baumwolle übertragen worden. Die meisten bewirken Wachstums- und Entwicklungsstörungen und liefern anomale Phänotypen. Andere liefern zwar normale Pflanzen, beeinflussen aber die Faserbildung nicht. Positive Effekte werden anscheinend nur mit Promotern erzielt, deren Expressionsprofil gut auf den Zeitverlauf der Faserzellinitiiierung abgestimmt ist. Normalerweise entwickeln sich ca. 10% der Epidermiszellen zu Langfasern, falls das Initiierungssignal 0-3 Tage nach der Anthese erscheint. Zellen, die 4 - 10 Tage nach der Anthese initiiert werden, werden zu Kurzfasern. Der *fbp7*-Promoter beginnt 2 Tage vor der Anthese aktiv zu werden und ist dann 10 Tage lang aktiv. Seine Aktivität überdeckt damit das Intervall, in welchem die Epidermiszellen durch IAA zur Bildung von Langfasern angeregt werden können. Die Expression des *fbp7-iaaM*-Transgens bewirkt eine Erhöhung des IAA-Pegels in den Epidermisschichten während der Faserinitiiierung und damit die Vermehrung der Langfasern bei gleichzeitiger Verminderung der Kurzfasern, weil sich mehr Epidermiszellen zu Langfasern entwickeln. Neben der raumzeitlichen Genauigkeit der Zielgenexpression ist auch ihre Höhe wesentlich. Schwache Promoter sind wirkungslos, während starke zu anomalem Wachstum führen. Die besten Erfolge werden anscheinend mit mittelstarken Promotern erzielt, bei denen die gebildete Hormonmenge einerseits ausreicht, um Ertrag und Qualität der Fasern positiv zu beeinflussen und andererseits auf das Zielgewebe beschränkt bleibt, so dass Wachstumsanomalien vermieden werden ([Zhang u. a., 2011](#)).

8 Biologische Sicherheit

8.1 Unbedenklichkeit und Erntequalität von Biotechpflanzen

8.1.1 Grundlagen der Risikobewertung

Mit dem Einzug der Gentechnik in die Pflanzenzüchtung sind in allen Ländern, in denen transgene Kulturpflanzen kommerziell angebaut werden, Gesetze und Institutionen geschaffen worden, die gewährleisten sollen, dass vom kommerziellen Anbau transgener Pflanzen keine Gefahren für Mensch, Tier und Umwelt drohen. Transgene Pflanzen dürfen nur zu Produktionszwecken angebaut und vermarktet werden, wenn sie von der zuständigen Zulassungsbehörde zum kommerziellen Anbau freigegeben worden sind. Für die Zulassung innerhalb der EU ist die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA (European Food Safety Authority) mit Sitz in Parma, Italien, zuständig. Die Behörde gibt regelmäßig überarbeitete Richtlinien heraus ([EFSA, 2011](#)), an die sich private und öffentliche Institutionen, die Pflanzen für den kommerziellen Sektor entwickeln, halten müssen, wenn diese zugelassen werden sollen. Diese Richtlinien sind recht umfangreich und geben detaillierte Anweisungen, welche Eigenschaften eine neue Biotechpflanze haben muss, wie diese Eigenschaften geprüft werden müssen und welche Daten mit dem Zulassungsantrag zu liefern sind. Dies betrifft die morphologische, genetische und biochemische Charakterisierung der neuen Sorte und ihrer nicht transgenen Elternpflanzen, die Durchführung und statistische Auswertung von Feldversuchen, Toxizitätsprüfungen und vieles andere.

Axiomatische Grundlage der Sicherheitsbewertung ist das Prinzip der substantiellen Äquivalenz ([König u. a., 2004](#)): Eine neue Biotechpflanze ist dann mindestens so sicher wie ihre Eltern, wenn sie bis auf die neuen Merkmale, welche für sich genommen ungefährlich sein müssen, hinsichtlich ihrer stofflichen Zusammensetzung, ihres Phänotyps, ihrer Bonität und aller anderen Eigenschaften mit ihren nicht transgenen Eltern identisch ist. Es liegt auf der Hand, dass ein vollständiger Vergleich nicht möglich ist und schnell an methodische und materielle Grenzen stößt. Die komplette Erfassung der stofflichen Zusammensetzung erforderte den Vergleich aller organischen und anorganischen Verbindungen in mindestens zwei Individuen. Unterschiede in Phänotyp und Bonität lassen sich nur statistisch erfassen, und dies erfordert ausgefeilte statistische Methoden und ausreichend große Stichproben. Gefundene Unterschiede müssen signifikant sein, d. h. deutlich außerhalb der natürlichen Varianz des untersuchten Merkmals liegen. Um den Vergleich durchführen zu können, muss man sich deshalb auf das eingeführte Merkmal beschränken und auf diejenigen Parameter, welche mit diesem in einem nachweislichen oder beim Stand der Forschung plausiblen Zusammenhang stehen. Zu den wichtigsten Elementen der Risikobewertung gehört die molekulargenetische Charakterisierung der neuen Sorte, der Vergleich ihrer phänotypischen, physiologischen und agronomischen Eigenschaften mit denen der Elternpflanzen, die Toxizitäts- und Allergenitätsprüfung der in Nahrungs- und Futtermitteln verwerteten Pflanzenteile, und, wenn diese Transproteine und/oder bei den Elternpflanzen nicht oder in anderen Mengen vorkommende antinutritive Substanzen enthalten können, die Klärung der beim Verbraucher maximal zu erwartenden Exposition.

8.1.1.1 Molekulargenetische Charakterisierung

Dabei geht es um Zahl und Struktur der ins Genom des Rezipienten eingeführten Fremd-DNA-Inserte, ihre Expression und um die Vererbungsstabilität der eingeführten Merkmale. Insbesondere soll dabei geklärt werden, ob die genetische Modifikation irgendein Potential zur Produktion neuer Toxine oder Allergene hat. Mit den Werkzeugen der modernen Bioinformatik kann man das mit einiger Sicherheit ausschließen. Damit lässt sich prüfen, ob durch die Insertionen Pflanzengene verletzt wurden, ob Fusionsproteine kodierende offene Leserahmen entstanden und ob pflanzliche Signalelemente (Promoterelemente, Spleißsignale) erzeugt oder verändert wurden, welche unbeabsichtigt die Genexpression beeinflussen könnten. Voraussetzung dieser Suche ist die Identifizierung aller im Empfänger-genom vorhandenen Fremd-DNA-Inserte, ihre Sequenzierung und ebenso die der Pflanzen-DNA in der Umgebung der Insertionsstellen. Wenn konkrete Anhaltspunkte für die mögliche Bildung aberranter, insbesondere toxischer oder allergener Genprodukte gefunden werden, muss versucht werden, ihre Expression bzw. Nichtexpression nachzuweisen und sie gegebenenfalls zu isolieren und zu charakterisieren. Zum Nachweis der Stabilität der neuen Merkmale verfolgt man deren Identität und Expression über 3-5 Pflanzengenerationen.

8.1.1.2 Vergleich von Probanden und Eltern

Der Vergleich der neuen Sorte mit ihren konventionellen Eltern bzw. nicht transgenen isogenen Linien soll klären, ob stoffliche Zusammensetzung, Phänotyp und Bonität der Biotechsorte und der daraus gewonnenen Futter- und Lebensmittel abgesehen von den neuen Merkmalen identisch mit den Eigenschaften der Vergleichsobjekte sind, oder ob es signifikante Unterschiede gibt. Wenn statistisch signifikante Abweichungen beobachtet werden, sind sie näher zu charakterisieren. Bei oligo- oder polytransgenen Sorten (Stapelsorten) ist zu prüfen, ob Wechselwirkungen zwischen den Merkmalen auftreten, die bei Monotransgenen nicht beobachtet werden können. Zur Klärung dieser Fragen werden gewöhnlich mehrjährige Feldversuche mit Test- und Vergleichspflanzen an verschiedenen Standorten durchgeführt, die im Anbaugebiet der Art liegen, sich jedoch in den standortbedingten Klima- und Bodenbedingungen möglichst deutlich unterscheiden. Die Versuche müssen so angelegt sein, dass sie mit den bei Sortenprüfungen gängigen statistischen Verfahren ausgewertet werden können und die natürliche Varianz der Merkmale berücksichtigen.

8.1.1.3 Toxizität

Die Toxizitätsprüfung ist der wichtigste Teil der Risikobewertung. Sie soll eindeutig zeigen, dass der Verzehr von einer neuen Biotechpflanze stammender Nahrungs- und Futtermittel innerhalb zu ermittelnder Unbedenklichkeitsgrenzen keine Gesundheitsgefahr für Mensch und Tier darstellt. Die Toxizitätsprüfung erstreckt sich prinzipiell auf alle in einer Biotechpflanze vorhandenen toxischen oder potentiell toxischen Substanzen. Insbesondere sind dies Transproteine und neu gebildete Metaboliten, aber auch endogene toxische Substanzen wie Erucasäure, Terpenoide oder Glykoside, wenn deren Konzentrationen sich verglichen mit den Elternpflanzen signifikant verändert haben. Toxizitätsprüfungen führt man in dafür zugelassenen entsprechend ausgerüsteten Laboratorien durch, wobei standardisierte international gebräuchliche Arbeitsvorschriften gelten, die im Wesentlichen denen entsprechen, welche zur Prüfung von Chemikalien entwickelt wurden. Als Testmaterial dienen die neuen Biotechpflanzen, insbesondere die Organe, die geerntet werden und die daraus hergestellten Nahrungs- und Futtermittel. Transproteine, die aus den Pflanzen nicht in genügender Menge gewonnen werden können, lassen sich prinzipiell in für toxikologische Untersuchungen ausreichender Menge auch in Bakterien produzieren, wobei sicherzustellen ist, dass das bakterielle Produkt mit dem pflanzlichen identisch ist und eine in der Pflanze nach der Translation mögliche Modifizierung des Proteins, z. B. dessen Glykosylierung, die toxikologischen Eigenschaften nicht verändert. Für die praktische Durchführung von Toxizitätstests benutzt man Versuchstiere, vor allem Nager, und *in-vitro*-Systeme in Form von Bakterien- und Säugerzellkulturen. Aus den zahlreichen zertifizierten Testverfahren, welche der Toxikologie hierfür zur Verfügung stehen (Fütterungsstudien über 28 oder 90 Tage, Hautreizungstests, Mutagenitätsprüfungen u. v. a.) sind diejenigen auszuwählen, die nach Maßgabe vorhandenen Expertenwissens für die zu testenden Proben infrage kommen. Dosis-Wirkungs-Studien mit Versuchstieren sind mit Gruppen durchzuführen, die so groß sind, dass eine statistische Auswertung möglich ist.

Transproteine müssen stets geprüft werden, es sei denn die Unbedenklichkeit wurde bereits nachgewiesen. Die Prüfung neuer in Pflanzen exprimierter Proteine umfasst die molekulare und biochemische Charakterisierung einschließlich der Aminosäuresequenz, der Molekülmasse, posttranslationeller Modifikationen und der biologischen Funktion. Bei Enzymen müssen umgesetzte Substrate, Reaktionsprodukte, Aktivatoren oder Inhibitoren bekannt sein, ferner alle enzymkinetischen Parameter wie pH- und Temperaturoptimum, Michaeliskonstanten und Wechselzahlen. Ferner sind Datenbankrecherchen durchzuführen, damit Sequenzhomologien mit bekannten Proteintoxinen erkannt werden. Von Bedeutung ist auch die Stabilität des Proteins in simulierten Verdauungsflüssigkeiten und der Charakter der beim proteolytischen Abbau entstehenden Peptidfragmente. Auch diese Untersuchungen sind wie schon die vorhergehenden recht umfangreich, stellen aber insofern keinen großen Zusatzaufwand dar, als es wenig Sinn hätte, Gene, die nicht charakterisierte Proteine unbekannter Funktion kodieren, in Nutzpflanzen zu übertragen.

8.1.1.4 Allergenität

Viele Pflanzen, darunter auch wichtige Nutzpflanzen wie Getreide und Sojabohnen enthalten Allergene, die bei empfindlichen (atopischen) Individuen Nahrungsmittelallergien hervorrufen können. Sie sind heute verbreitet und bilden ein ernsthaftes Gesundheitsproblem. Die Veranlagung zur Allergenität ist erblich. Die allergische Reaktion hat 2 Phasen, Sensibilisierung und Auslösung (Provokation) der Symptome. Zur Sensibilisierung kann Hautkontakt oder Inhalation des Allergens bereits genügen. Bei sensibilisierten Personen können schon kleine Mengen des Allergens ausreichen, um schwere Krankheitssymptome auszulösen. Die

meisten bekannten Allergene sind Proteine. Auch manche beim Abbau eines Proteinallergens gebildeten Peptidfragmente können noch Allergenwirkung zeigen. Ferner gibt es Proteine, welche zwar selbst nicht allergen sind, aber zusammen mit einem Allergen als Adjuvantien (Allergenitätsverstärker) wirken.

Wie bei der Toxizität wird bei der Allergenitätsprüfung getestet, ob ein neues Transprotein, die Pflanze dies es exprimiert oder die daraus hergestellten Nahrungsmittel potentiell oder aktuell allergen sind und, wenn sich das bestätigt, ob die Allergenität höher ist als bei den nicht transgenen Vergleichsobjekten. Zur Identifizierung potentieller Allergenität kommen insbesondere *in-silico*-Studien, d. h. Datenbankrecherchen mit den Methoden der Bioinformatik in Betracht, mit denen sich heute nicht nur Sequenzhomologien sondern auch strukturelle Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinallergenen, von denen es viele gibt, erkennen lassen. Wenn bei der Suche Treffer gefunden werden, sind in jedem Falle experimentelle Allergenitätstests notwendig. Sie werden auch durchgeführt, wenn das neue Protein zwar nicht allergen ist, die Vergleichspflanzen aber natürliche Allergene enthalten. Die Transformation könnte die Genexpression des Rezipienten beeinflussen und dabei die Expression endogener Allergene verstärken.

Die verbreitetsten Allergien werden durch Antikörper (Immunglobuline) der Klasse E (IgE) ausgelöst. Auf deren Nachweis konzentriert man sich im Test. Bei Transgenen, die aus Getreidearten stammen, wird im Hinblick auf die heute verbreiteten Glutenallergien auch geprüft, ob das Genprodukt glutensensitive Enteropathien auslösen kann, die nicht durch IgE vermittelt werden. Da Antikörper die Oberflächenstrukturen ihrer Zielallergene erkennen, muss das getestete Protein mit dem von der Pflanze gebildeten strukturell identisch sein. Proteine, welche aus den Testpflanzen nicht in ausreichenden Mengen isoliert werden können und deshalb ersatzweise in Colibakterien produziert werden, erfüllen diese Forderung nur bedingt, da Pflanzen posttranslationelle Modifikationen durchführen können, zu denen die Bakterien nicht imstande sind. Viele Proteinallergene sind relativ stabil gegenüber Verdauungsenzymen wie Pepsin. Wenn auch keine strikte Korrelation besteht, so gilt Pepsinresistenz doch als unspezifischer Hinweis auf mögliche Allergenität. Man testet erstere unter standardisierten Reaktionsbedingungen. Zu berücksichtigen ist, dass sich natürliche Verdauungsbedingungen *in vitro* nur unvollkommen realisieren lassen und diese auch nicht bei allen Individuen und Bevölkerungsgruppen identisch sind. Zum spezifischen Nachweis gegen Allergene gerichteter Antikörper gibt es mehrere hochempfindliche immunochemische Methoden. Im Prinzip misst man dabei die Fähigkeit spezifischer Immunglobuline des Serums allergischer Individuen, die Testproteine zu binden. Die Stärke der Immunantwort ist individuell verschieden.

8.1.1.5 Ernährungsqualität

Die ernährungsphysiologische Bewertung von Biotechpflanzen stammender Lebens- und Futtermittel soll zeigen, ob diese unter Berücksichtigung der natürlichen Varianz mit den Vergleichsobjekten identisch sind. Dies ergibt sich aus der Analyse der stofflichen Zusammensetzung. Sind sie nicht identisch, so werden die identifizierten Veränderungen und ihre möglichen Auswirkungen auf die Ernährungsqualität weiter untersucht. Bei Sorten mit modifiziertem Nährstoffgehalt sind Fütterungsstudien notwendig, für die wiederum standardisierte Regeln gelten. Geprüft werden dabei Aufnahme und Bioverfügbarkeit der modifizierten Nährstoffe, Wachstum, Fressverhalten, Körpergewicht allgemeiner Gesundheitszustand der Tiere und noch manches andere. Im Einzelnen hängt der Versuchsplan von der Tier- und Pflanzenart und den zu untersuchenden Merkmalen ab und muss so gestaltet sein, dass eine zuverlässige statistische Auswertung möglich ist.

8.1.2 Eigenschaften verbreitet gebildeter Fremdproteine

Die hier beschriebenen Biotechsorten wichtiger Nahrungspflanzen (Tab. 24) unterscheiden sich abgesehen von den neu gebildeten Proteinen so gut wie nicht von ihren konventionellen Gegenständen. Deshalb konzentriert sich die Bewertung von Gesundheitsrisiken, die der Verzehr dieser Biotechpflanzen oder daraus hergestellter Lebensmittel darstellen könnte, vor allem auf die Frage, ob diese Proteine im menschlichen Körper toxische, allergene oder andere nachteilige Wirkungen entfalten können. Vielfach ist dies allein schon deswegen als unwahrscheinlich anzusehen, weil sie in den geernteten Pflanzenteilen nicht oder nur in geringen Mengen gebildet werden. Die beiden Lauricatrapslinien 23-18-17 und 23-198 z. B. exprimieren das NPTII-Enzym in einer Konzentration von 0,0008% der gesamten Proteinfraction des Pflanzengewebes. Handelsfertige Lebensmittel enthalten gewöhnlich keine Biotechproteine mehr. In Rübenzucker und Melasse sind PAT und NPTII auch mit den empfindlichsten Methoden, die heute zur Verfügung stehen, nicht mehr nachweisbar. Beim Raps dient nur das verarbeitete Samenöl Ernährungszwecken. Es enthält keine Proteine mehr und besteht zu 96 - 97% aus gereinigten Triacylglycerolen. Resistenzgene, die von konstitutiven Promotoren geregelt werden, können im

Phänotyp	Fremdprotein	Transgen	exprimiert von
Glyphosatresistenz	EPSPS	<i>cp4-epsps</i>	Raps: MON 00073-7; Soja: MON-04032-6, MON-89788-1, A2704-12; Zuckerrübe: GTSB77, H7-1
Glyphosatresistenz	GOX	<i>gox247</i>	Raps: MON 00073-7
Glufosinatresistenz	PAT	<i>bar</i>	Raps: ACS-BN004-7 x ACS-BN001-4; Mais: DKB-89790-5, EV176
Glufosinatresistenz	PAT	<i>pat</i>	Soja: A2704-12; Zuckerrübe: T120-7
Kanamycinresistenz	NPTII	<i>neo</i>	Raps: 23-18-17, 23-198; Mais: MON 863; Zuckerrübe: T120-7
Insektenresistenz	Cry1Ab	<i>cry1Ab</i>	Mais: DKB-89790-5, MON 810, EV 176
Insektenresistenz	Cry3Bb1	<i>cry3Bb1</i>	Mais: MON 863
hoher Lysingehalt	DHDPS	<i>cordapA</i>	Mais: LY038
bildet Laurinsäure	TE	<i>te</i>	Raps: 23-18-17, 23-198
bildet hitzestabile α -Amylase und Phosphomannoseisomerase	AMY, PMI	<i>amy797E</i> , <i>pmi</i>	Mais: Event 3272
männl. Sterilität	Barnase, Barstar	<i>barnase</i> , <i>barstar</i>	Raps: ACS-BN004-7 x ACS-BN001-4
Farbmarker	GUS	<i>uidA</i>	Soja: DD-026005-3; Zuckerrübe GTSB77
hoher Ölsäuregehalt	FDH	<i>gmFad2-1</i>	Soja: DD-026005-3
Selektionsmarker	LAC	<i>bla</i>	Soja: DD-026005-3

Tab. 24. Fremdproteine kommerziell angebauter Biotechsorten.
 CP4-EPSPS 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (*Agrobacterium tumefaciens*);
 GOX Glyphosatoxidase (*Ochrobactrum anthropi*);
 PAT Phosphinothricin-Acetyltransferase (*Streptomyces hygroscopicus*, *S. viridochromogenes*);
 NPT II Neomycinphosphotransferase (*E. coli*);
 DHDPS Dihydrodipicolinat-Synthase (*Corynebacterium glutamicum*);
 Cry1Ab, Cry3Bb1 δ -Endotoxine von *Bacillus thuringiensis*;
 TE 12:0-Acyl-Carrier-Protein-Thioesterase (*Umbellularia californica*);
 Barnase Ribonuklease (*Bacillus amyloliquefaciens*);
 Barstar Ribonukleaseinhibitor (*Bacillus amyloliquefaciens*);
 GUS β -Glucuronidase (*E. coli*);
 LAC β -Lactamase (*E. coli*);
 FDH δ -12-Fettsäuredehydrogenase (*Glycine max*);
 AMY: α -Amylase (*Thermococcus sp.*)
 PMI: Phosphomannoseisomerase (*E. coli*).

Rapspollen exprimiert werden und von dort in den Bienenhonig gelangen. Tatsächlich wurde mit dem ELISA-Test, einer recht empfindlichen immunologischen Nachweismethode, in Honigproben das NPTII-Protein in einer Konzentration von 1,61 ng/mg Pollenprotein entdeckt. Man fand es in Honig, der von das *nptII*-Gen exprimierendem Biotechrops stammte. Ein 500g-Topf enthielt demnach 0,00125 µg (0,0000025 ppm) NPTII-Protein (OGTRb, 2002). Aus Soja hergestellte Lebensmittel werden vor dem Verzehr durchweg erhitzt, so dass nur die denaturierten biologisch inaktiven Proteine in den Körper gelangen. Zur Frage, ob von Biotechpflanzen gebildete Fremdproteine toxisch oder allergisch sind, gibt es zahlreiche Publikationen und eine Fülle von Daten. Insgesamt gesehen hat bisher kein Zulassungsverfahren konkrete Anhaltspunkte dafür geliefert, dass der Verzehr von Biotechprodukten für Menschen oder Nutztiere mit gesundheitlichen Risiken verbunden ist. Hinzu kommen die in den vergangenen 20 Jahren mit dem weltweiten Anbau von Biotechpflanzen und der Verwertung der Ernte erworbenen Erfahrungen.

8.1.2.1 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase

5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS) ist ein Enzym des Shikimatsynthesewegs und katalysiert die Verknüpfung von Phosphoenolpyruvat und Shikimat-3-Phosphat zu 5-Enolpyruvyl-3-Shikimatphosphat, einem Vorläufer der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Diese Aminosäuren sind nicht nur wesentliche Bestandteile der Proteine sondern werden zur Synthese vieler anderer von Pflanzen gebildeter aromatischer Verbindungen gebraucht. Durch Glyphosat wird pflanzliche EPSPS kompetitiv, d. h. durch Verdrängung des natürlichen Substrats, gehemmt. Die Blockierung der EPSPS durch Glyphosat enthaltende Herbizide bewirkt den Ausfall zentraler Stoffwechselwege, was schnell zum Absterben der Pflanzen führt. Das Enzym kommt nur bei Pflanzen und Mikroorganismen vor, aber nicht bei Tieren. Diese synthetisieren selbst keine aromatischen Aminosäuren, sondern nehmen diese mit der Nahrung auf. Dies erklärt, warum Glyphosat für Tiere kaum toxisch ist. Das *cp4-epsps*-Gen stammt aus einem Agrobakterienstamm und kodiert eine modifizierte EPSPS, welche Glyphosat kaum bindet und deshalb gegen den Wirkstoff unempfindlich ist.

CP4-EPSPS ist ebenso wie pflanzliche EPSPS sehr spezifisch für ihr Substrat 3-Enolpyruvat-Shikimat-5-Phosphat. Die Aminosäuresequenzen beider Enzyme sind nahezu identisch und haben keinerlei Ähnlichkeit mit den Sequenzen bekannter Proteintoxine oder -allergene. EPSP-Synthasen kommen in allen Pflanzen und ebenso in Pilzen und Bakterien vor. In künstlichen Verdauungsflüssigkeiten, mit denen sich das biochemische Milieu im Magen oder Dünndarm annähernd simulieren lässt, wird CP4-EPSPS innerhalb von 15 s zu 95% hydrolytisch abgebaut. Fütterungs- und Verdaulichkeitsstudien mit Sojafuttermitteln an Mäusen und anderen Versuchstieren, darunter Fischen, Küken, Wachteln und Milchkühen bestätigen die gute Verträglichkeit. Die Ernährungsqualität der transgenen Sorten gleicht derjenigen konventioneller Pflanzen auch dann, wenn viel größere Mengen an Soja verfüttert werden, als sie in Sojaprodukten normalerweise zu erwarten sind. Auch wenn gereinigte CP4-EPSPS in einer Dosis von bis zu 570 mg/kg Körpergewicht an Mäuse verfüttert wird, beobachtet man keine Vergiftungserscheinungen. Dies ist eine Menge, welche die beim Verzehr von Biotechsojaprodukten zu erwartende Zufuhr an CP4-EPSPS um mehr als das tausendfache übersteigt. Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die CP4-EPSPS transgener Ackerpflanzen weder endogene pflanzliche Verbindungen in toxische Produkte umwandeln noch im menschlichen Körper toxische oder allergene Wirkungen entfalten kann.

8.1.2.2 Glyphosatoxidoreduktase

Glyphosatoxidoreduktase (GOX), wandelt Glyphosat in 2 ungiftige Abbauprodukte um, Aminomethylphosphonsäure (AMPA) und Glyoxylat. Ihr Gen (*gox*) stammt ursprünglich aus dem Bakterium *Ochrobactrum anthropi*. Die Sequenz des Gens wurde modifiziert, um die Affinität des Enzyms für Glyphosat zu steigern. Die modifizierte Form heißt *goxv247*. Das Gen kodiert ein Polypeptid mit einer Länge von 431 Aminosäuren. Von der Wildform unterscheidet sich das modifizierte Enzym durch den Austausch von drei Aminosäuren. GOX beschleunigt den normalen Abbau von Glyphosat zu Aminomethylphosphonsäure (AMPA) und Glyoxylat. AMPA wird durch verschiedene Mikroorganismen abgebaut. Glyoxylat ist ein normaler Metabolit des pflanzlichen Lipidstoffwechsels. Es wird in dem danach benannten Glyoxylsäurezyklus umgesetzt, der es keimenden Samen ermöglicht, im Speichergewebe (Endosperm) des Samens vorrätige Fette in Saccharose und Kohlenhydrate umzuwandeln. Biotechpflanzen wie Biotechrops MON 00073-7, der EPSPS und GOX exprimiert, haben eine doppelt abgesicherte Resistenz gegen Glyphosat. Alle mit dem EPSPS-Enzym beschriebenen Sicherheitsprüfungen sind auch mit GOX durchgeführt worden und lieferten keine Hinweise auf qualitätsmindernde oder gesundheitsschädliche Eigenschaften GOX-bildender Nutzpflanzen.

8.1.2.3 Phosphinothricinacetyltransferase

Phosphinothricinacetyltransferase (PAT), das Produkt des *bar*-Gens des Bodenpilzes *Streptomyces hygroscopicus*, katalysiert die Anheftung einer Acetylgruppe an Phosphinothricin (Glufosinat), was den Herbizidwirkstoff unwirksam macht. Das Enzym hat keinerlei Sequenzähnlichkeit mit bekannten toxischen oder allergisch wirkenden Proteinen, noch hat es die für solche Proteine typische Stabilität gegen Hitze oder proteolytische Verdauungsenzyme. Vielmehr wird es im Verdauungstrakt von letzteren schnell abgebaut. Fütterungsversuche an Mäusen und Ratten ergaben keine Anhaltspunkte für toxische Eigenschaften, selbst dann nicht, wenn große Mengen verfüttert werden oder wenn man Versuchstieren PAT in hohen Dosen intravenös injiziert. Auch von dem überall im Boden vorkommenden *Streptomyces hygroscopicus* sind keine nachteiligen Effekte auf Menschen, Tiere oder Pflanzen bekannt geworden ([Herouet u. a., 2005](#)).

Die von A2704-12 exprimierte Phosphinothricinacetyltransferase von *Streptomyces viridochromogenes* ist ebenfalls ungiftig und führt bei Versuchstieren auch bei Verabreichung hoher Dosen nicht zu Vergiftungserscheinungen oder Beeinträchtigungen des Wohlbefindens. Das Enzym ist ebenso wie die von den glyphosatoleranten Biotechsorten exprimierte EPSPS hochspezifisch für sein Substrat, was die Bildung toxischer Nebenprodukte in den transgenen Pflanzen sehr unwahrscheinlich macht. PAT hat auch kein nennenswertes Allergenitätspotential. Dies zeigen Recherchen in den großen Sequenzdatenbanken und *in-vitro*-Experimente mit künstlichen Verdauungsflüssigkeiten. Weitere Bestätigung finden diese bereits vor 1998 durchgeführten Studien darin, dass inzwischen über 90% der amerikanischen Sojaernte das EPSP-Protein enthalten und sowohl glyphosat- als auch glufosinatresistente Biotechpflanzen in vielen Ländern der Welt kultiviert werden, ohne dass nachteilige Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen oder seiner Nutztiere bekannt geworden sind.

8.1.2.4 Neomycinphosphotransferase

Neomycinphosphotransferase II, NPTII, die von Biotechmais MON863 und einigen anderen Biotechpflanzen in geringen Mengen gebildet wird, ist ein Bakterienenzym, welches Neomycin, Kanamycin und verwandte Antibiotika durch Phosphorylierung zu entgiften vermag und Bakterien eine Antibiotikaresistenz verleiht. Es handelt sich um einen bakteriellen Selektionsmarker, den man benutzt, um in einer heterogenen Bakterienkultur diejenigen Bakterienzellen zu isolieren, welche das Plasmid enthalten. Wenn derartige Plasmide zur Transformation von Pflanzen eingesetzt werden, kann das *nptII*-Gen ins Pflanzengenom übertragen werden. Der Phänotyp verändert sich dabei nicht. Das NPTII-Protein ist nicht allergen und ungiftig. Es hat keine Sequenz- oder Strukturhomologien zu bekannten Proteintoxinen oder Allergenen. Toxizitätsprüfungen an Säugern sind negativ. *nptII*, welches eine Resistenz gegen die Antibiotika Neomycin und Kanamycin verleiht, wird seit Jahren sicher in transgenen Nahrungspflanzen eingesetzt. Resistenzen gegen diese Gruppe von Antibiotika sind bei natürlich vorkommenden Mikroorganismen im Menschen und in der Umwelt weit verbreitet ([Fuchs u. a., 1993](#)). Es ist theoretisch denkbar, dass dem Tierfutter zugesetzte Antibiotika wie Neomycin oder Kanamycin in ihrer Wirkung herabgesetzt werden, falls zur Herstellung des Futters aus kanamycinresistentem Biotechmais stammendes Samenmehl, welches Spuren des NPTII-Enzyms enthält, verwendet wird. Nachweislich ist dies aber nicht der Fall ([CERAA](#)). Aus diesen Gründen sind nationale und internationale Zulassungsbehörden bisher regelmäßig zu dem Ergebnis gekommen, dass die Verwendung von *nptii* in kommerziell angebauten Biotechpflanzen unbedenklich ist ([EFSA, 2004](#)).

8.1.2.5 Dihydrodipicolinatsynthase

Dihydrodipicolinatsynthase (DHDPS) ist ein Enzym des pflanzlichen Lysinstoffwechsels. Das pflanzliche Enzym wird durch Lysin, das Endprodukt des Lysinsynthesewegs, gehemmt. So entsteht eine negative Rückkopplungsschleife, welche die Lysinkonzentration in der Zelle unabhängig vom Lysinverbrauch konstant hält, was man als Endprodukthemmung bezeichnet. Die lysinangereicherte Maislinie LY038 synthetisiert eine Dihydrodipicolinatsynthase (DHDPS) von *Corynebacterium glutamicum*, welche durch Lysin nicht gehemmt wird und ihre Aktivität auch in Gegenwart hoher Lysinkonzentrationen behält. Durch Expression dieses Enzyms im transgenen Mais kann die Endprodukthemmung des Lysinsynthesewegs aufgehoben werden. Die Lysinkonzentration in der Zelle erreicht dann weit höhere Werte als im konventionellen Mais, wodurch der Lysinmangel der Maisfuttermittel ausgeglichen werden kann. *Corynebacterium glutamicum* ist im Boden weit verbreitet. Auch die Dihydrodipicolinatsynthasen sind in der Natur weit verbreitet. Toxische oder allergene Wirkungen der DHDPS von *Corynebacterium* sind weder experimentell beobachtet worden, noch sind solche

nach Sequenzvergleichen mit toxischen und immunogenen Proteinen plausibel. Auch der direkte Verzehr von LY038-Körnern stellt demnach kein Gesundheitsrisiko dar ([Lucas u. a., 2004](#)).

8.1.2.6 Thioesterase

Die Rapslinien 23-198 und 23-18-17 exprimieren das Gen für die 12:0-Acyl-Carrier-Protein-Thioesterase (TE) der kalifornischen Lorbeerbaums *Umbellularia californica*. TE ist eine Komponente eines großen Enzymkomplexes des Lipidstoffwechsels. Ihre Expression im Raps bewirkt die Bildung großer Mengen von Laurinsäure im Endosperm des Samens. Als Fettsäurekomponente ist Laurinsäure in der Natur weit verbreitet. Man findet sie nicht nur im Palmkern- und Kokosnussöl sondern auch in vielen anderen Pflanzenfetten. Auch in der Kuhmilch kommt Laurinsäure vor. Thioesterasen sind in der Natur ebenfalls weit verbreitet, da sie zur enzymatischen Grundausstattung lebender Zellen gehören. Die TE des kalifornischen Lorbeerbaums ist wie die übrigen im Biotechrap und -mais exprimierten Fremdenzyme nicht hitzestabil und wird wie diese von Proteasen und simulierten Verdauungsflüssigkeiten schnell zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut. Sie hat keine Sequenzhomologien zu bekannten Proteintoxinen oder -allergenen, und es sind keine experimentellen Befunde bekannt, die auf toxische oder allergene Eigenschaften schließen lassen.

8.1.2.7 α -Amylase und Phosphomannoseisomerase

Event-3272-Mais bildet 2 neue im konventionellen Mais nicht vorkommende Proteine, die rekombinierte thermostabile α -Amylase AMY797E und Phosphoisomerase aus *E. coli*. Die Amylase findet man ausschließlich im Endosperm des Maiskorns, die Phosphomannoseisomerase auch in anderen Pflanzengewebe. AMY797E ist ungiftig und wird im Verdauungstrakt schnell abgebaut. Die Aminosäuresequenz zeigt keine Sequenzhomologien zu bekannten Proteinallergenen. α -Amylasen sind ubiquitäre, in der Natur weit verbreitete Enzyme. Auch der menschliche Speichel enthält Amylasen. Mikroorganismen bilden außerordentlich viele, darunter auch hitzestabile, Amylaseformen. Nachteilige Auswirkungen, die der Kontakt mit diesen Proteinen haben könnte, sind nicht bekannt. Da die Event-3272-Amylase beim Kochen nicht inaktiviert wird und Stärke in Oligo- und Monosaccharide zerlegen kann, ist geprüft worden, ob sich der Zuckergehalt von Lebensmitteln, in denen dieser Mais mitverwendet wurde, beim Kochen verändern kann. Hersteller und Zulassungsbehörden kamen zu dem Ergebnis, dass mindestens, solange der neue Mais ganz überwiegend in der Ethanolproduktion verwendet wird, nachteilige Auswirkungen für die menschliche Ernährung nicht zu erwarten sind.

Phosphomannoseisomerase ist ein in der Natur verbreitetes Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels. Man findet sie beim Menschen, bei Säugern, Pflanzen, Pilzen und Bakterien. Toxische Varianten dieses Enzyms sind nicht bekannt. Die Maus verträgt Dosen von 3g/kg Körpergewicht ohne Schaden. Allergenitätstests sind negativ. Die Peptidkette des Enzyms enthält zwar einen kurzen, 8 AS langen Sequenzabschnitt, welcher auch bei einem bekannten Allergen vorkommt; immunologische Studien mit Humansenen ergeben aber keine Kreuzreaktivität.

8.1.2.8 Barnase und Barstar

Die bei männlich sterilen Biotechrapslinien wie ACS-BN004-7 x ACS-BN001-4 vorhandenen Barnase- und Barstar-Proteine bilden ein transgenes männliches Sterilitätssystem, welches in der Hybridenzüchtung eingesetzt werden kann. *barnase* kodiert eine Ribonuklease (Barnase), *barstar* den RNA-Inhibitor Barstar, welcher mit Barnase einen stabilen Proteinkomplex bildet und die RNase so zu inaktivieren vermag. Beide Proteine entstammen *Bacillus amyloliquefaciens*. Im proteinfreien Rapsöl sind die beiden Proteine nicht nachweisbar. Sie sind zudem ungiftig und nicht allergen. Die Suche nach Genen und Proteinen mit ähnlichen Sequenzen in den großen Sequenzdatenbanken ergibt keinerlei Homologien zu toxischen oder allergenen Proteinen. Kaninchen und Kanarienvögel, die mit Samen der MS/RF-Biotechrapslinien gefüttert wurden, zeigen keine Beeinträchtigung des Wohlbefindens. Ribonukleasen und Desoxyribonukleasen sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen nicht nur in Bakterien, sondern auch in Höheren Organismen vor. Im menschlichen Körper werden sie in großer Menge in der Bauchspeicheldrüse gebildet und in den Dünndarm sezerniert, wo sie die Verdauung mit der Nahrung aufgenommener Nukleinsäuren ermöglichen.

8.1.2.9 Bt-Toxine

Die Cry1Ab- und andere Bt-Toxine haben keine nachweisbaren toxischen oder allergenen Wirkungen. Bakterielle Bt-Toxine werden seit mehr als 40 Jahren zur Herstellung kommerzieller Bt-Präparate verwendet, ohne dass negative Auswirkungen auf Gesundheit oder Umwelt bekannt geworden sind. Cry1Ab und Cry3Bb1 gehören zu den δ -Endotoxinen, welche spezifisch an bestimmte Bindungsstellen (Rezeptoren) der Mitteldarminnenwand empfindlicher Insekten gebunden werden. Infolge der Bindung bilden sich in der

Membran der Epithelzellen kationenspezifische Kanäle, und infolge des einsetzenden Kationenstroms wird das Ionengleichgewicht der Epithelzellen zerstört, wobei diese zugrundegehen. Cry1Ab ist nur für Schmetterlinge giftig und nicht für andere Organismen, da diesen die Toxinbindungsstellen fehlen. So findet man bei Fütterungsversuchen weder bei Vögeln noch bei Säugern Anzeichen einer toxischen Wirkung. Das Cry1Ab-Toxin lässt sich auch in transformierten Colibakterien produzieren, wobei man wesentlich größere Mengen gewinnen kann als aus Bt-Biotechpflanzen. An Labormäuse verfüttert, zeigt es auch in großen Mengen keine negativen Auswirkungen. So zeigen Mäuse, welche das Toxin in Dosen von bis zu 4 g/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 9 Tagen aufgenommen haben, keine Beeinträchtigung des Wohlbefindens. Diese Dosis ist 200 - 1000 mal höher als die Menge, die beim Verzehr von Körnern der Sorte MON810 aufgenommen wird. Die Unbedenklichkeitsschwelle des aus Bakterien gereinigten Cry3Bb1-Proteins, welches der gegen den Maiswurzelbohrer resistente MON863-Biotechmais bildet, liegt 4 Größenordnungen höher als die im Körper nach Verzehr von MON863-Mais zu erwartende Bt-Toxinkonzentration. Im Unterschied zu manchen Proteintoxinen und -allergenen werden die Bt-Toxine nach der Aufnahme rasch verdaut. Nach Versuchen mit simulierten Verdauungsflüssigkeiten, welche die im Dünndarm vorkommenden Verdauungsenzyme enthalten, ist Cry1Ab bereits innerhalb von 2 min zu 90% abgebaut. Die Aminosäuresequenz des verkürzten Proteins ist eng mit derjenigen des bakteriellen Bt-Toxins verwandt. Sie hat keinerlei Ähnlichkeit mit bekannten für Säuger oder für den Menschen giftigen Proteintoxinen oder Proteinen, die beim Menschen Allergien auslösen können. Im Unterschied zu vielen Proteinallergenen ist Cry1Ab nicht glykosyliert, d. h. es gibt in der Peptidkette keine mit Zuckermolekülen verknüpften Aminosäuren. Im Hinblick auf die Verwendung von Maisprodukten als Diät-nahrungsmittel ist erwähnenswert, dass die Sequenz auch keine Ähnlichkeit mit den Gliadinen des Weizens hat. Diese Proteine werden als Ursache einer erblich bedingten Lebensmittelunverträglichkeit angesehen, die bei den Betroffenen zu chronischen Darmerkrankungen führt. Maisprodukte bilden für diesen Personenkreis eine wichtige Alternative zum Weizenmehl ([Betz u. a., 2000](#); [EPA, 2005](#)).

8.1.3 Biochemische Analysen

8.1.3.1 Gesamtzusammensetzung

Da die Transformation einer Pflanze ihre stoffliche Zusammensetzung verändern und damit ihren Ernährungswert beeinflussen kann, wird erstere im Rahmen der Zulassungsverfahren umfassend geprüft. Wie bei den übrigen Bonitätsprüfungen kultiviert man hierzu nach Abschluss vorausgegangener Labor- und Gewächshausversuche die neue Sorte zusammen mit ihren nicht transgenen Eltern und weiteren konventionellen Sorten an mehreren geographisch und klimatisch verschiedenen Freilandstandorten. So erhielt man die Datenbasis für die Qualitätsprüfung der glyphosatoleranten Sojabohne MON 89788 aus Feldversuchen, die 2005 an 5 verschiedenen US-amerikanischen Standorten durchgeführt wurden. An jedem Standort wurde MON 89788 zusammen mit der nicht transgenen Elternlinie A3244 angebaut. Um die natürliche Variabilität der analysierten Komponenten statistisch erfassen zu können, baute man an jedem Standort 12 weitere konventionelle Sojalinien an. Die Zusammensetzung des Samenöls der insektenresistenten Bollgard-II-Baumwolle ergab sich aus der Analyse der Bollgard-II-Sorte, der konventionellen Elternlinien und 4 weiteren nicht transgenen Varietäten und deren Anbau an 5 verschiedenen Standorten des US-amerikanischen Baumwollgürtels. Man vergleicht die Zusammensetzung der Biotechsorte mit derjenigen der nicht transgenen Kontrollpflanzen und sucht nach statistisch signifikanten Unterschieden.

Bei der Analyse der stofflichen Gesamtzusammensetzung untersucht man Parameter wie den Gehalt an Fasern, Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Feuchtigkeit und Mineralien (Magnesium, Eisen, Kupfer, Zink u. a.). Statistisch signifikante Differenzen zwischen einer Biotechsorte und ihren konventionellen Eltern findet man nur selten. So ist bei der gegen den Maiswurzelbohrer resistenten Biotechmaissorte MON 863 der Kohlenhydratanteil geringfügig höher als bei den nicht transgenen Eltern. Gleichzeitig ist der Gehalt an P, Mg, Zn, Mn, und Vitamin E niedriger. Die Abweichungen sind gering und liegen innerhalb der Variationsbreite konventioneller Maiskultivare.

8.1.3.2 Aminosäureprofile

Die Mengenverhältnisse der 20 regelmäßig in Proteinen vorkommenden Aminosäuren unterscheiden sich bei Biotechpflanzen und konventionellen Nahrungspflanzen nicht. Dies gilt auch für die essentiellen Aminosäuren Valin, Methionin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Threonin und Lysin, die vom Menschen mit der Nahrung aufgenommene werden müssen, wenn es nicht zu Mangelerscheinungen kommen soll. Vereinzelt findet man auch hier Abweichungen. So ist beim MON-863-Mais der Gehalt an Cystein, Asparaginsäure und Glycin

höher, derjenige von Leucin, Phenylalanin und Glutaminsäure niedriger als bei den nicht transgenen Eltern. Die Abweichungen sind wiederum gering und liegen innerhalb des Variationsbereichs kommerzieller nicht transgener Maiskultivare.

Eine Ausnahme bildet der als Futterzusatz entwickelte lysinangereicherte Mais LY038. Die samenspezifische Expression einer bakteriellen Dihydropicolinatsynthase im LY038-Mais produziert ein Maiskorn mit höherem Lysingehalt und höherem Ernährungswert. Beim konventionellen Mais liegt der Gesamtlysingehalt zwischen 2500 und 2800 ppm, wovon der größte Teil in Proteinen gebunden ist. Der Gehalt an freiem Lysin beträgt etwa 100 ppm. Demgegenüber haben LY038-Körner einen Gehalt von 1000 - 2500 ppm an freiem Lysin und einen Gesamtlysingehalt von 3500 - 5300 ppm. Abgesehen vom höheren Gehalt an freiem Lysin und seinen Abbauprodukten zeigen LY038-Pflanzen weder fassbare Veränderungen des Phänotyps noch Abweichungen in der biochemischen Zusammensetzung der Körner. Die quantitative Analysen von ca. 85 verschiedenen Metaboliten - 75 aus dem Korn und 10 aus der Pflanze - ergab keinerlei Abweichungen von den Werten konventioneller Linien.

8.1.3.3 Fettsäureprofile

Die Konzentrationsprofile essentieller und nichtessentieller Fettsäuren sind bei transgenen und konventionellen Ölpflanzen gleich. Ausgenommen hiervon sind transgene Raps- und Sojakultivare, welche Modifikationen im Fettstoffwechsel tragen. Die Expression einer Thioesterase des kalifornischen Berglorbeers im Speichergewebe des Rapssamens hat zur Folge, dass Laurinsäure und in geringerem Umfang Myristinsäure synthetisiert wird. Beim Lauricatrap (23-18-17, 23-198) kann der Laurinsäuregehalt bis zu 50% betragen, während er bei konventionellem Canola weniger als 0,1% beträgt. Niedriger als beim Standardcanolaraps ist dagegen der Gehalt an anderen Fettsäuren wie Ölsäure, Linolensäure, Palmitinsäure. Die Ölzusammensetzung entspricht derjenigen von Palmkern- und Kokosölen, die ernährungsphysiologisch gesehen durch Lauricatrapöl ersetzt werden können. Der gesamte Lipidgehalt des Samens ist trotz dieser Verschiebungen unverändert.

Die von DuPont Canada Agricultural Products entwickelten DD-026005-3-Sojabohnen tragen eine genetische Modifikation des Fettsäurestoffwechsels, durch welche die Synthese von Linolensäure und längerkettigen Fettsäuren aus Ölsäure im Samen verhindert wird. Dies führt zur Anreicherung von Ölsäure im Samen. DD-026005-3-Sojabohnen liefern ein Öl, das zu über 80% aus Ölsäure besteht, verglichen mit nur 23% bei normalen Sojabohnen. Der Ölsäureanteil ist damit höher als beim Raps- und Olivenöl. Gleichzeitig ist der Gehalt an gesättigten Fettsäuren um 33% niedriger als beim normalen Sojaöl. Ölsäureangereichertes Sojaöl enthält auch keine Transfettsäuren mehr. Es ist hitzestabiler als gewöhnliches Sojaöl und bleibt bei Zimmertemperatur flüssig. Insgesamt stellen diese Veränderungen eine wesentliche Verbesserung der Ernährungs- und Verarbeitungsqualität des Sojaöls dar. Biochemisch unterscheiden sich die neuen Linien abgesehen vom veränderten Fettsäureprofil kaum von ihren konventionellen Vorläufern.

8.1.3.4 Reservestoffe

Transgene Maiskörner, Raps- Soja- und Baumwollsaamen enthalten gleiche Mengen an Speicherproteinen, Kohlenhydraten, Fetten, Phytinsäure und Vitaminen wie die Samen konventioneller Sorten. Geringe Abweichungen von den Werten der nicht transgenen Elternlinien fand man u. a. beim Kohlenhydratgehalt von MON-863-Maiskörnern und dem Mengenverhältnis der beiden Samenspeicherproteine Glycinin und β -Conglycinin der DD-026005-3-Sojabohnen. Der Kohlenhydratgehalt von MON-863-Maiskörnern ist geringfügig höher als derjenige der Eltern. Bei DD-026005-3-Sojabohnen ist der Glycininpegel höher und der β -Conglycininpegel niedriger als bei den Eltern. In beiden Fällen liegen die Abweichungen innerhalb des Toleranzbereichs kommerzieller Kultivare.

8.1.3.5 Nebenprodukte

Manche der in Biotechpflanzen eingeführten Fremdenzyme bewirken bei der Umsetzung ihres Substrats die Bildung in der Pflanze vorher nicht vorhandener Verbindungen. Glyphosatoleranter MON-0073-7-Raps exprimiert eine bakterielle Glyphosatoxidase, welche Glyphosat in Glyoxylat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA) zerlegt. Glyoxylat ist ein normaler Metabolit des pflanzlichen Lipidstoffwechsels. Es wird in dem danach benannten Glyoxylsäurezyklus umgesetzt, der es keimenden Samen ermöglicht, im Speichergewebe (Endosperm) des Samens vorrätige Fette in Saccharose und Kohlenhydrate umzuwandeln. AMPA wird durch verschiedene Mikroorganismen abgebaut. Wenn es in den menschlichen Körper gelangt, wird es unverändert wieder ausgeschieden. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass weder vom Glyphosat noch von AMPA eine

Gefahr für die menschliche Gesundheit droht ([Williams u. a., 2000](#)). Die aus dem kalifornischen Berglorbeer stammende Thioesterase der Biotechmaissorte LY038 erhöht den Gehalt an freiem Lysin im Korn. Im Körper von Nutztieren bewirkt LY038 nach Verfütterung die Vermehrung von zwei Abbauprodukten des Lysins, Saccharopin und α -Aminoadipinsäure, die in vielen Lebensmitteln (Linsen, Broccoli Blumenkohl, Spargel u. a.) vorkommen und, wie mehrere Studien ergaben, ungefährlich sind.

Die wenigen bisher in verbreitet angebaute Ackerpflanzen eingeführten Fremdenzyme haben eine recht hohe Substratspezifität. Sie setzen nur ihre natürlichen Substrate um, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass ihre Expression in heterologen Wirtspflanzen zur Bildung ungewöhnlicher oder schädlicher Metaboliten führt, und solche sind auch nirgends gefunden worden.

8.1.3.6 Antinutritiva, Toxine und Allergene

Raps, Soja und Baumwolle enthalten Proteine und andere organische Verbindungen, welche die Verdaulichkeit herabsetzen, in größeren Mengen giftig sind oder Allergien hervorrufen können. Bereits bekannte Unverträglichkeitsfaktoren werden deshalb in die Analyse der stofflichen Zusammensetzung neu entwickelter Biotechsorten einbezogen, um sicherzugehen, dass diese Substanzen in der Biotechsorte nicht in größeren Mengen gebildet werden als in ihrer nicht transgenen Ausgangsform.

Soja

Ein bekannter Unverträglichkeitsfaktor des Sojasamens ist der Trypsininhibitor. Das Protein hemmt die normale Proteinverdauung bei Mensch und Tier. Weitere Antinutritiva des Sojasamens sind Phytinsäure, Raffinose und Stachyose. Sojasamen enthalten außerdem verschiedene Proteine mit allergenen Eigenschaften. Eines der allergenen Samenproteine der Sojabohne, Gly-m-Bd-30-K, macht etwa 1% des Gesamtproteins des Samens aus. Mehr als 65% der Sojaallergiker reagieren auf dieses Protein. Deshalb ist es als eines der bedeutendsten Sojaallergene anzusehen. Gly-m-Bd-30-K ist die α -Untereinheit des β -Conglycinins, eines der Hauptspeicherproteine des Sojasamens. Ein erheblicher Teil des Proteins bleibt bei der industriellen Fraktionierung der Sojasamenproteine mit diesen assoziiert, so dass es in den meisten Lebensmittelprodukten enthalten ist, zu deren Herstellung Sojamehl verwendet wird. Alle diese Unverträglichkeitsfaktoren findet man bei Biotechsoja in ähnlichen Mengen wie in den Samen der nicht modifizierten Stammlinien.

Raps

war wegen seines Gehalts an Erucasäure und Glucosinolaten ursprünglich als Nahrungsquelle weder für den Menschen noch für Tiere geeignet. Erucasäure führt bei Laborratten zur Verfettung des Herzmuskels und zu Herzfunktionsstörungen. Glucosinolate bewirken im Tierversuch Thymusvergrößerungen. Canolavarietäten müssen spezifischen Anforderungen im Hinblick auf den Gehalt an Erucasäure und Glucosinolaten genügen. Sie müssen ein Öl liefern, welches weniger als 2% Erucasäure enthält und ein ölfreies Mehl mit einem Gehalt von höchstens 30 $\mu\text{mol/g}$ an Glucosinolaten. Das Öl transgener Rapsvarietäten wie der glyphosattoleranten Sorte GT 73 entspricht dem festgelegten Standard und ist von derselben Qualität wie gewöhnliches Canolaöl.

Baumwolle

Baumwollsamensamen können, wenn sie in großen Mengen verzehrt werden, toxisch wirken, da sie unverträgliche oder giftige Substanzen wie Gossypol und Cyclopropanfettsäuren enthalten. Gossypol ist ein Herz und Leber schädigendes Terpenoid. Der Gossypolgehalt des Samens beträgt bis zu 1,5%. Nach Entfernung dieser Verbindungen können die Samen zu Produkten verarbeitet werden, die in Lebensmitteln verwendbar sind. Baumwollsamensamen enthalten ca. 21% Öl und 23% relativ hochwertiges Protein. In Zentralamerika und Indien ist der Verzehr von Baumwollsamensmehl üblich. Hinsichtlich ihres Gehalts an Gossypol und Cyclopropanfettsäuren unterscheiden sich insekten- und/oder herbizidresistente Baumwollvarietäten wie Bollgard II (MON-15985-7) und LLCotton25 von konventionellen Baumwolllinien nicht.

8.1.4 Fütterungsstudien

Wenn die beschriebenen Analysen einer neuen Biotechsorte keine Anhaltspunkte für qualitätsmindernde Inhaltsstoffe liefern, verfüttert man die Pflanzen und ihre Ernteprodukte an Labormäuse und -ratten, Kühen, Schweine und andere Nutztiere und vergleicht ihre Entwicklung mit Kontrollgruppen, die mit den nicht transgenen Varietäten gefüttert wurden. Als Indikatoren dienen neben Veränderungen im Verhalten und Allgemeinzustand der Tiere zahlreiche Messgrößen wie Wachstum, Futteraufnahme, Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten und anatomisch-histologische Beschaffenheit innerer Organe am Ende der Versuchsperiode.

Diese Fütterungsexperimente werden nach international gültigen standardisierten Protokollen durchgeführt, die von der OECD für Toxizitätsprüfungen an Versuchstieren entwickelt wurden. Zwei Beispiele seien betrachtet.

8.1.4.1 Biotechsoja GTS-40-3-2

Der Ernährungswert der glyphosattoleranten Biotechsoja GTS-40-3-2 wurde an fünf Nutztierarten geprüft, die mit rohen und zu Mehl verarbeiteten Sojasamen gefüttert wurden. Das Programm umfasste 2 vierwöchige Studien mit Ratten, eine vierwöchige Studie mit Milchkühen, eine sechswöchige Studie mit Küken, eine fünftägige Studie mit Wachteln und eine zehnwöchige Studie mit Welsen. Jede Versuchstiergruppe bestand aus einer Testgruppe, welche transgenes Futter erhielt und mindestens einer Kontrollgruppe, die mit Samen oder Mehl der nicht transgenen Elternlinie oder anderer konventioneller Sojakultivare gefüttert wurde. Die Ergebnisse wurden mit gängigen statistischen Methoden ausgewertet und verglichen. Statistisch signifikante mit der Fütterung korrelierte Unterschiede fand man nicht. Nach diesen Studien sind Ernährungswert und Verträglichkeit der Bietsorte mit den Werten konventioneller Sojabohnen vergleichbar, und dies gilt auch dann, wenn weit größere Mengen verfüttert werden, als in einer Sojaprodukte enthaltenden Humandiät zu erwarten sind ([CERAa](#)).

8.1.4.2 Bietchmais MON863

Die Verträglichkeit der gegen den Maiswurzelbohrer resistenten Bietchmaislinie MON863 wurde vor der Zulassung an 400 6 ½ Wochen alten Laborratten untersucht. Diese wurden in 20 Gruppen aus je 20 Tieren unterteilt und gruppenweise 13 Wochen lang mit einer Diät gefüttert, die entweder MON863-Körner (11% und 33%, w/w) enthielt oder Körner der nicht transgenen Elternlinie LH82xA634 (11% und 33%, w/w) oder Körner von 6 kommerziellen nicht transgenen Maislinien (33%, w/w). LH82xA634 hat den Genotyp von MON863, trägt aber nicht das Gen des Cry3Bb1-Toxins, welches für die Insektenresistenz der Sorte verantwortlich ist.

In der Studie ([Burns, 2002](#)) werden zahlreiche Merkmale quantitativ erfasst, die als Toxizitätsindikatoren infrage kommen, wie Überlebensrate, Krankheitssymptome, Körpergewichtsveränderungen, Organgewichte, makroskopische und mikroskopische Organpathologien sowie zahlreiche biochemische Parameter in Blut und Harn. Signifikante Unterschiede zwischen den Test- und Kontrollgruppen wurden kaum gefunden. Der Monsanto-Bericht erwähnt einen nichtpathologischen gewebekundlichen Nierenbefund, welcher zeigt, dass bei mit 33% MON863 gefütterten Weibchen die Bildung mineralischer Ablagerungen in den Nierentubuli etwas geringer ist als bei allen anderen Gruppen. Die in der 5. und 14. Versuchswoche durchgeführten Blut- und Urinuntersuchungen zeigen bei einigen Parametern geringe statistisch signifikante Differenzen zwischen den Testgruppen und den Kontrollen. Monsanto und ebenso die Zulassungsbehörden maßen den Abweichungen keine biologische Bedeutung bei und kamen zu dem Ergebnis, dass bei den Versuchen keine Anhaltspunkte einer möglichen Toxizität von MON863 gefunden werden konnten.

Europäischen Umweltorganisationen, die seit eh und je die Agrogentechnik bekämpfen, sind die in der Monsanto-Studie erwähnten vereinzelt aufgetretenen statistisch signifikanten Differenzen zwischen Testgruppen und Kontrollen nicht verborgen geblieben. CRIIGEN (Committee for Research & Independent Information on Genetic Engineering), eine französische Nichtregierungsorganisation (NGO), welche nach eigener Darstellung „Gegen-Expertisen“ zu Fragen um gentechnisch veränderte Organismen anfertigt und verbreitet, erhob im November 2003 Beschwerde gegen eine Entscheidung der französischen Behörde CADA (Commission d'Accès aux Documents Administratifs), um Einsicht in die Akten der 90-Tage-Rattenstudie von Monsanto zu bekommen. CADA hatte die Studien für vertraulich erklärt, aber CRIIGEN gewann die Auseinandersetzung und informierte anschließend die Medien. „Le Monde“ und andere Tageszeitungen berichteten nun über die Fütterungsversuche. Die britische Daily Mail titelte in ihrer Ausgabe vom März 2007: „GM corn „could cause liver and kidney damage““ ([Daily Mail, 2007](#)). Greenpeace verlangte darauf vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) die Herausgabe der gesamten, mehr als 1000 Seiten umfassenden Rohdaten der Rattenstudie. Monsanto weigerte sich zunächst, wurde jedoch durch ein höchstichterliches Urteil des Oberverwaltungsgerichts Münster vom 20. Juni 2005 gezwungen, die Akten an Greenpeace herauszugeben. Wenig später veröffentlichte Greenpeace die von den Zulassungsbehörden als vertraulich eingestuften Daten im Internet und beauftragte eine für CRIIGEN arbeitende französische Forschergruppe mit der nochmaligen statistischen Analyse der Monsanto-Daten. Eigene Fütterungsstudien wurden nicht durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden im März 2007 unter dem Titel: „New Analysis of a Rat Feeding Study with a Genetically Modified Maize Reveals Signs of Hepatorenal Toxicity“

veröffentlicht. Die Zusammenfassung der Arbeit endet: „...with the present data it cannot be concluded that GM corn MON863 is a safe product“ ([Séralini u. a., 2007](#)).

Schon bald nach dem Bekanntwerden wurden die Vorwürfe von verschiedenen Behörden unter die Lupe genommen, darunter der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA ([EFSA, 2007b](#)), der französische Lebensmittelsicherheitsbehörde AFSSA ([AFSSA01, 2007](#)), der französischen Gentechnik-Kommission CGB ([CGB, 2007](#)) und dem deutschen Bundesinstitut für Risikobewertung BfR ([BfR, 2007](#)). Auch nach wiederholter Beurteilung aller vorliegenden Daten, unter Einbezug der Kritikpunkte von Séralini u. a., konnten die Experten keine neuen Hinweise für eine Gesundheitsgefahr von MON863 finden. Alle Zulassungsbehörden blieben deshalb bei ihren bereits früher abgegebenen Stellungnahmen, wonach MON863 keine negativen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt hat.

Eine weitere Veröffentlichung derselben Autorengruppe erschien 2009 im „International Journal of Biological Sciences“ ([Spiroux u. a., 2009](#)). Darin wurde auch die Sicherheitsbewertung für die herbizidtolerante Maissorte NK603 in Zweifel gezogen. Ohne detaillierte Analyse wurde wieder die statistische Auswertung der Fütterungsstudien für das Zulassungsverfahren grundsätzlich in Frage gestellt. Auch hier rief Greenpeace nach einem Stopp der Zulassung und des Anbaus von "Genpflanzen". Die neuen Vorwürfe riefen die AFSS-Gutachter erneut auf den Plan, die wiederum urteilten, dass die Studie wie schon die erste methodisch mangelhaft und wissenschaftlich wertlos sei ([AFSSA02, 2010](#)).

Einer der beiden Kernpunkte der ersten Veröffentlichung ([Séralini u. a., 2007](#)) ist die Präsentation von Wachstumskurven, die aus dem wöchentlich ermittelten Mittelwert des Körpergewichts der Ratten jeder Gruppe während der Versuchsdauer von 90 Tagen errechnet wurden. Sie zeigen eine Verringerung der Gewichtszunahme bei den männlichen mit 11% MON863-Anteil im Futter gefütterten Ratten und eine Steigerung der Gewichtszunahme bei den weiblichen 33%-MON863-Ratten, bezogen auf die Wachstumskurven der mit isogenem nicht transgenem LH82xA634-Mais gefütterten Kontrollgruppen. Die Publikation erwähnt die Wachstumskurven der männlichen 33%-Ratten und die der weiblichen 11%-Ratten nicht. Ein paarweiser Vergleich der Modellparameter wird nicht erwähnt. Der Arbeit fehlt jede Bezugnahme auf die Variationsbreite der Fütterungsdaten, die von den 6 Kontrollgruppen stammen, die mit konventionellen Referenz-Maisvarietäten gefüttert wurden. In dem Gutachten der französischen Lebensmittelsicherheitsbehörde AFSSA vom 26. April 2007 ([AFSSA01, 2007](#)) wird dies nachgeholt. Aus den Grafiken, die dem Gutachten als Anhang beigelegt sind, kann ohne Schwierigkeiten abgelesen werden:

- Die Wachstumskurven zeigen keine positive Korrelation mit der Dosis des aufgenommenen MON863-Futters (11% oder 33%). Sie sind aber deutlich korreliert mit der insgesamt aufgenommenen Futtermenge, und die Wachstumsunterschiede lassen sich widerspruchsfrei damit erklären, dass die männlichen MON863-Ratten während der Versuchsdauer weniger, die weiblichen MON863-Ratten mehr gefressen haben als die jeweiligen Kontrollen.
- Die Gewichtsvariationen liegen bei 3%-4%, was für biologische Parameter wenig ist. Bei der Auswertung 90-tägiger Toxizitätsstudien an Ratten ist es deshalb üblich, Gewichtsunterschiede erst dann als Toxizitätsindikatoren zu werten, wenn sie am Ende der Versuchsperiode mindestens 10% betragen.
- Die beobachteten Unterschiede sind nicht größer als die Gewichtsfluktuationen zwischen den Kontrollgruppen, welche mit 6 verschiedenen konventionellen Maislinien gefüttert wurden.

Der zweite Kernpunkt der Séralini-Studie ist die Beobachtung, dass ca. 10% der Blut- und Harnwerte der Versuchstiergruppen statistisch signifikante Abweichungen von den Kontrollen zeigen. Hier zeigt ein Blick in die entsprechenden Tabellen ([Séralini u. a., 2007](#)) und der Vergleich mit den Originaldaten ([Burns, 2002](#)):

- Die Abweichungen liegen nur wenig über der Signifikanzschwelle, sind regellos über den ganzen Datenbestand verteilt und völlig unkorreliert.
- Insbesondere zeigen sie nicht die geringste Korrelation mit der MON863-Dosis (11% oder 33%), der Dauer der Exposition oder dem Geschlecht der Tiere.
- Gerade diejenigen Parameter, die vor allem als Toxizitätsindikatoren infrage kommen (Alaninamino-transferase, Alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltransferase, Aspartataminotransferase) sind unverändert. Mit Ausnahme der Alaninaminotransferase, bei welcher einer von insgesamt 4 Messwerten eine geringe statistisch signifikante Veränderung zeigt, werden diese Enzyme in der Arbeit nicht erwähnt.

Paracelsus (1493-1541) wußte: „*Dosis sola venenum facit.*“ (Allein die Dosis macht das Gift). Seitdem gehört diese Erkenntnis zum Grundwissen jedes Toxikologen. Um als Toxizitätsindikatoren interpretiert werden zu können, müssen Blut- und Harnwerte ebenso wie andere quantitativ bestimmbare biologische Parameter deutlich von den Kontrollen abweichen. Die Differenzen müssen eindeutig mit der Dosis des vermuteten Gifts korrelieren, als für den Organismus schädlich interpretierbar sein und in dieser Hinsicht konvergieren. Außerdem müssen sie von Organdefekten begleitet sein, die sich auch anatomisch, mindestens aber histologisch erkennen lassen. In der ersten AFSSA-Stellungnahme ([AFSSA01, 2007](#)) liest man hierzu:

„Die Autoren dieser Publikation beschränken sich darauf, bei 58 von insgesamt rund 500 Messwerten statistisch signifikante Abweichungen festzustellen, ohne den geringsten Versuch zu unternehmen, den toxikologischen Aussagewert der Differenzen zu prüfen. Sie scheinen die elementare Regel zu verkennen, die regelmäßig von der wissenschaftlichen Gemeinschaft und den internationalen Institutionen unterstrichen wird, wonach man wissen muss, dass eine statistisch signifikante Differenz nicht notwendig zu einer biologischen Schlussfolgerung führt.“

Neben MON863 gibt es mehrere weitere Biotechmaissorten, die eines oder mehrere Gene für Bt-Toxine tragen (MON863 x MON810, MON88017, MON863 x NK603, MON863 x MON810 x NK603). In jedem Falle sind den OECD-Richtlinien entsprechende 90-tägige Toxizitätsstudien mit Ratten durchgeführt worden. In allen diesen Studien findet man geringe sporadische Abweichungen einzelner Parameter, ohne dass ein Trend erkennbar wird, den man als Hinweis auf einen leber- oder nierenschädigenden Effekt deuten könnte. Zudem gibt es mehrere weitere Fütterungsstudien mit MON863-Mais an anderen Tieren, darunter Hühnern, Schweinen und Rindern. In keinem Fall fand man Hinweise auf einen Unterschied zwischen MON863 und gewöhnlichem Mais. Auch die von den Autoren erhobene Forderung nach längeren Versuchszeiträumen dürfte nach bisheriger Erfahrung nicht zur Entdeckung noch unbekannter toxischer Effekte führen. Eine über 25 Monate an Milchkühen durchgeführte Langzeitfütterungsstudie mit Bt-Mais MON810 - er bildet das Cry1Ab-Protein - zeigt jedenfalls die Gleichwertigkeit von MON810 und gewöhnlichem Mais ([Steinke u. a., 2010](#)).

Biotechmais ist 2009 auf 26% (41,7 Mio. ha) der globalen Maisanbauflächen von damals 158 Mio. ha angebaut worden. In den USA sind heute fast alle Maisfelder transgen. 75% der Sorten sind Stapelsorten, die mindestens ein Bt-Toxin bilden. Brasilien pflanzte 2009 in der Sommer- und Wintersaison jeweils 5 Mio. ha Bt-Mais (30% bzw. 50% der Maisanbaufläche). In Südafrika, wo Bt-Mais seit 2001 gegessen wird, belegte Bt-Mais 2009 $\frac{2}{3}$ der zur menschlichen Ernährung gebrauchten Maisanbaufläche ([ISAAA, 2009](#)). In Deutschland wurde der Bt-Maisanbau im April 2009 verboten, um - so offizielle Begründungen - die Bürger vor möglichen Gesundheits- und Umweltgefahren zu schützen.

Ähnlich äußerte sich das Bundesverfassungsgericht in seinem Urteil vom 24. November 2010, in welchem die Verfassungsmäßigkeit des deutschen Gentechnikgesetzes bestätigt wird ([BVerfG, 2010](#)). In den Leitsätzen zur Urteilsbegründung wird der Gesetzgeber auf seine besondere Sorgfaltspflicht und Verantwortung für die künftigen Generationen und die natürlichen Lebensgrundlagen hingewiesen, die das Gericht angesichts des „noch nicht endgültig geklärten Erkenntnisstandes der Wissenschaft bei der Beurteilung der langfristigen Folgen eines Einsatzes von Gentechnik“ gefährdet sieht. Weiter liest man: „Risiken und Chancen dieser (Anm.: landwirtschaftlichen) Nutzung sind umstritten und nicht abschließend geklärt.....Indem gentechnisch veränderte Organismen...in die Umwelt ausgebracht werden, können sie sich in dieser fortpflanzen und ausbreiten. Die Auswirkungen können unumkehrbar sein.“ (Gründe, I. 1. Abs. 2).

Offenbar hat es die höchsten deutschen Richter bei der Urteilsfindung nicht gestört, dass man ihre Vorstellungen vom Wesen der Gentechnik in fachkompetenten wissenschaftlichen Disziplinen wie der Mikrobiologie, Genetik, Molekularbiologie und Pflanzenphysiologie durchweg für überholte Fehleinschätzungen hält. Die Befürchtung, die Freisetzung transgener Organismen sei gleichbedeutend mit einer unkalkulierbaren und möglicherweise nicht wieder gutzumachenden Gefährdung natürlicher Lebensgrundlagen und kommender Generationen entstand in der Frühzeit der Gentechnik vor mehr als 30 Jahren. Zwar wird sie seitdem von ihren prinzipiellen Gegnern unablässig wiederholt; sie ist aber längst durch eine überwältigende Fülle praktischer Erfahrungen widerlegt.

8.2 Umweltverträglichkeit des kommerziellen Biotechpflanzenanbaus

8.2.1 Grundlagen der Risikobewertung

Der Freilandanbau transgener Pflanzen ist keine Umweltschädigung an sich. Er kann dann zu einer Gefahr für das Ökosystem werden, wenn die angebauten Sorten durch ihre Transgene bedingte Eigenschaften haben, die bewirken können, dass andere Organismen unmittelbar oder mittelbar geschädigt werden. Dies trifft z. B. auf insektenresistente Bt-Pflanzen zu, da Bt-Toxine nicht nur gegen den Maiszünsler oder Maiswurzelbohrer wirksam sind sondern auch gegen verwandte Schmetterlinge bzw. Käfer. Die Prüfung der Umweltsicherheit neuer Biotechpflanzen verfolgt das Ziel, potentielle Schäden, welche ihr Anbau verursachen könnte, rechtzeitig zu erkennen, zu analysieren und das Schadensrisiko, d. h. die Wahrscheinlichkeit, dass der beabsichtigte Anbau zu einem Schadensfall führt, nach Möglichkeit zu quantifizieren. Wie bei der Prüfung der Ernährungssicherheit vergleicht man hierzu die neue Pflanze mit ihren nicht transgenen Eltern oder auch mit anderen, den Eltern genetisch möglichst ähnlichen konventionellen Linien. Wie dabei vorzugehen ist, ergibt sich aus umfassenden Sicherheitsrichtlinien und Prüfvorschriften, welche von der EFSA und anderen Zulassungsbehörden regelmäßig herausgegeben werden ([EFSA, 2010](#)).

Damit eine Biotechpflanze die Umwelt verändern kann, muss sie mit dieser interagieren. Viele Aspekte der Umweltsicherheit lassen sich deshalb nur durch Feldversuche eindeutig klären. Diese müssen, um aussagekräftig zu sein, wie bei agrarischen Bonitätsprüfungen üblich, an mehreren Standorten, möglichst unter verschiedenen Wetter- und Klimabedingungen und mit genügend großen Stichproben durchgeführt werden. Zudem ist mit Langzeiteffekten zu rechnen. Die Resistenzentwicklung im Feld z. B., die mit dem jahrelangen großflächigen Einsatz von Totalherbiziden wie Glyphosat und Glufosinat verbunden ist, benötigt nach bisherigen Erfahrungen mindestens 10 Jahre, bis sie beginnt, zu einem wirtschaftlichen Problem zu werden. Sie macht es notwendig, den Anbau auch nach der Markteinführung zu überwachen. Gleichzeitig erzeugt sie einen starken Innovationsdruck zur Entwicklung verbesserter Sorten, neuer Pestizide und besserer Bewirtschaftungsformen, mit denen sich bereits etablierte Resistenzen umgehen lassen.

In natürlichen und auch in agrarischen Ökosystemen leben viele Tier- und Pflanzenarten, die man nicht alle auf etwa auftretende Schädigungen untersuchen kann. Man muss sich auf eine begrenzte Zahl ausgewählter Leitorganismen und Versuchsparmeter beschränken. Zudem muss schon vor Beginn der Versuchsplanung Klarheit darüber herrschen, welche konkreten Risiken man erforschen will. Imaginäre Gefahren („Superunkräuter“, „Monsterpflanzen“) entziehen sich jedem rationalen Bewertungsversuch. Prinzipiell können negative ökologische Auswirkungen des Biotechpflanzenbaus durch direkte (Nahwirkung) oder indirekte (Fernwirkung, auch zeitlich) Interaktionen der Biotechpflanzung mit anderen Lebewesen zustandekommen. Bei Pflanzen, welche Biozide bilden, können sowohl Zielorganismen als auch Nichtzielorganismen betroffen sein. Direkte Interaktionen entstehen in einem Biotechpflanzenfeld z. B. dann, wenn Raupen eines Nichtzielschmetterlings an einer Bt-Pflanze fressen und daran zugrundegehen oder, was bisher allerdings nicht beobachtet wurde, ein Kanamycinresistenzgen einer solchen Pflanze durch horizontalen Gentransfer in ein Bodenbakterium gelangt und diesem Kanamycinresistenz verleiht. Indirekte Interaktionen sieht man insbesondere in der Verbreitung von Transgenen durch Pollenflug und der nachfolgenden Etablierung von transgenen Wildpopulationen bei Arten wie Raps und Rübe, die beide relativ leicht mit wilden Verwandten lebensfähige Bastarde bilden.

8.2.2 Totalherbizide

8.2.2.1 Umweltverträglichkeit

Glyphosat

Glyphosat ist im Gegensatz zu fast allen anderen gebräuchlichen Herbiziden ungiftig und im Boden leicht abbaubar. Deswegen dient sein Einsatz dem Gewässerschutz und der Vielfalt der Makro- und Mikrofauna der Ackerflächen. Nach allen bisher durchgeführten Feldstudien hat der Anbau herbizidtoleranter Biotechpflanzen keine negativen Auswirkungen auf Bienen, Regenwürmer oder andere Tiere, die man gewöhnlich in den Feldern findet. Z. B. bildet Pollen glyphosatresistenter Rapspflanzen keine Gefahr für Rapsblüten besuchende Honigbienen und für Bienenlarven ([Huang u. a., 2004](#)).

Infolge seiner Breitbandwirkung vermag Glyphosat die anderen Herbizide zu ersetzen und kann als Nachauflaufferbizid eingesetzt werden. Anstatt den Boden schon vor der Aussaat mit Herbiziden zu behandeln, was beim konventionellen Soja- und Rapsanbau üblich ist, kann der Bauer mit der Unkrautbekämpfung warten,

Herbizid	WHO-Toxizitätsklasse	1995	2001
2,4-D	II	10	4
Acifluorfen	III	12	3
Alachlor	III	4	<1
Bentazon	III	12	1
Clethodim	II	5	4
Clomazone	II	4	<1
Fenoxaprop	III	6	3
Flumetsulam	III	2	<1
Fomesafen	III	4	7
Glyphosat	III	20	76*
Imazaquin	III	15	2
Imazethapyr	III	44	9
Metribuzin	II	11	2
Paraquat	II	2	-
Pendimethalin	III	26	10
Quizalafop	III	6	<1
Sethoxydim	III	7	1

Tab. 25. Prozentualer Anteil der US-amerikanischen Sojaflächen, die in den Jahren 1995 und 2001 mit den genannten Herbiziden behandelt wurden. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) kennt 4 Toxizitätsklassen: Ia extrem toxisch, Ib stark toxisch, II mäßig toxisch, III leicht toxisch. *2001 waren 68% der US-amerikanischen Sojaflächen glyphosatolerant. ([CERAA](#), [PAN](#)).

bis nach der Aussaat aufgelaufene Unkräuter zu einem wirtschaftlichen Problem zu werden beginnen. Die Anwendung nach der Keimung spart Arbeit, und die aufgelaufenen Unkräuter schützen den Boden vor Erosion.

Der Anbau glyphosatoleranter Sorten bewirkt eine wesentliche Reduzierung des Herbizideinsatzes (Tab. 25). Dies gilt sowohl für die Zahl der verwendeten Herbizide als auch für die der notwendigen Feldbehandlungen und die insgesamt versprühten Herbizidmengen. Da weniger Sprühungen erforderlich sind, müssen die Landmaschinen seltener eingesetzt werden, was Treibstoff spart und der unerwünschten Bodenverdichtung entgegenwirkt. Die Kosten der Unkrautbekämpfung sind beim Einsatz von Totalherbiziden etwa um die Hälfte niedriger. Gleichzeitig liegen die Hektarerträge höher, im Zuckerrübenbau um bis zu 6%. Die Substituierung der bisher verwendeten Herbizide durch das relativ ungiftige leicht abbaubare Glyphosat verringert die Pestizidbelastung der Landarbeiter und entlastet die Umwelt. Nach Schätzungen brauchten in Europa 7,5 Mha weniger mit Pestiziden besprüht zu werden, wenn 50% der mit Mais, Raps, Rüben und Baumwolle bestellten Flächen mit Biotechsorten bepflanzt würden. Dies bedeutete die jährliche Einsparung von 20 Millionen l Diesel und würde den CO₂-Ausstoß um jährlich um 73'000 t reduzieren ([Phipps & Park, 2002](#)). Die Verringerung des Herbizideinsatzes hat neben direkten Auswirkungen auf das Agrarökosystem indirekte Auswirkungen auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit insofern, als sie ermöglicht, die Pestizidproduktion und die damit verbundenen Emissionen zurückzufahren.

Einige Zahlen mögen verdeutlichen, wie rasch die Umstellung der Sojaproduktion auf den Anbau von glyphosatresistenten Sorten vonstatten ging und welche Auswirkungen dies auf den Herbizideinsatz, die Ernterträge und die Einkommen der Farmer hatte. Die ersten herbizidtoleranten Sojabohnen wurden in den USA im Frühjahr 1996 angebaut. Im Jahr 2005 wurden bereits auf ca. 87% der amerikanischen Sojaanbaufläche und auf 60% der globalen Sojaanbaufläche Roundup-Ready-Sojabohnen kultiviert ([CERAA](#)). Zwischen 1995 und

2001 haben die US-amerikanischen Sojafarmer zur Bekämpfung von Unkräutern mindestens 16 verschiedene mehr oder weniger giftige Herbizide eingesetzt (Tab. 25). Der einzelne Farmer hat seine Sojafelder mit bis zu fünf verschiedenen Herbiziden behandelt, um konventionelle Sojabohnen vor Unkräutern zu schützen. Parallel mit der Ausdehnung des Anbaus glyphosatoleranter Sorten ist in diesem Zeitraum der Anteil der mit Glyphosat behandelten Sojaflächen von 20 auf 76% gestiegen, und der Einsatz anderer Herbizide ging entsprechend zurück. Die erforderlichen Herbizidmengen reduzierten sich dabei im mittleren Westen der Vereinigten Staaten um 9% und im Südwesten um bis zu 39%. 1997 war es möglich, den Herbizideinsatz im mittleren Westen um 11% und im Südwesten um 30% zu reduzieren. Auch die Anzahl der pro Vegetationsperiode erforderlichen Spritzungen ging zurück. 1997 haben in Amerika ca. 70% der Farmer Roundup-Ready Sojabohnen nur einmal mit Roundup behandelt, 29% zweimal und nur 1% dreimal oder häufiger. Die Ernteerträge verbesserten sich im

Mittel um 5%, in manchen Regionen um bis zu 24%. Dabei entspricht eine Ertragssteigerung um 5% einer Einkommensverbesserung von 30 USD pro Hektar für den Farmer ([Europabio](#)).

In Ländern, wo Biotechrops großflächig angebaut wird, kennt man die Umweltauswirkungen des Biotechrops-anbaus aus langjähriger Erfahrung. Der Einsatz von Herbiziden wird drastisch reduziert. In Westkanada, wo im Jahr 2000 auf 55% der 5 Mha des mit Raps bebauten Ackerlands transgene Canolasorten kultiviert wurden, sind 6 Mio. kg weniger Herbizide eingesetzt worden als vor der Einführung der Biotechropsvarietäten. Die Farmer konnten gleichzeitig mehr als 31 Mio. Liter Dieselöl einsparen, weil sie ihre Ackerschlepper seltener einsetzen mussten. Dies bedeutete nicht nur die Verminderung der unerwünschten Bodenverdichtung sondern auch die Einsparung von 110'000 t Kohlendioxid.

Auch bei der Zuckerrübe ist der Anbau herbizidtoleranter Sorten umweltfreundlicher als die konventionelle Produktion. Die Unkrautbekämpfung ist wirksamer und wesentlich einfacher als bei konventionellen Kulturen. Während bei selektiven Herbiziden meist 3 oder 4 Sprühungen pro Saison erforderlich sind, reichen bei herbizidtoleranten Zuckerrüben 2 oder 3 nach dem Auflaufen der Saat. Gleichzeitig ist der Erfolg bei weitem nicht so stark von Außeneinflüssen wie der Witterung oder dem Zeitpunkt der Anwendung abhängig wie bei den konventionellen Mitteln. Die erste Sprühung muss erst erfolgen, wenn die Keimlinge 6-8 Blätter entwickelt und eine Höhe von 10 cm erreicht haben. Dies verringert den Blattlausbefall der Rübenkeimlinge, weil Blattläuse auch gern auf jungen Unkräutern weiden. Gleichzeitig erhält der Boden durch die dichtere Pflanzendecke einen besseren Schutz vor Winderosion. Die Unkräuter müssen erst vernichtet werden, wenn sie beginnen, mit den Rüben um Licht, Wasser und Nährstoffe zu konkurrieren.

Man erreicht die vollständige Abtötung aller Unkräuter mit nur einem Herbizid. Selektive Herbizide haben eine von der Unkrautart abhängige Wirksamkeit, weshalb man mehrere Mittel einsetzt, die oft in Form komplexer Mixturen angewandt werden. Man kennt mehr als 120 zur konventionellen Unkrautbekämpfung in Zuckerrübenfeldern dienende Herbizide mit 19 selektiven Herbizidwirkstoffen ([May u. a., 2003](#)), deren Wirksamkeit von der Zusammensetzung der Unkrautflora abhängt. Die Wahl der besten Methode gelingt oft nur mit der Hilfe spezialisierter landwirtschaftlicher Beratungsdienste. Biotechrüben brauchen nur ein Herbizid, das unter allen Bedingungen in der vom Hersteller empfohlenen Dosis in 2 oder 3 Sprühungen im Abstand von 2 Wochen ausgebracht werden kann. Im typischen Fall benötigt die HT-Varietät weniger Sprühungen, weniger Herbizide und keine mechanische Unkrautentfernung (Tab. 26). Glyphosat- und Glufosinatherbizide hemmen

das Keimlingswachstum herbizidtoleranter Rüben selbst bei Überdosierung nicht, während selektive Herbizide bei Überdosierung, schlechter Wahl des Sprühzeitpunkts oder ungünstiger Witterung eine zeitweilige Vergilbung der Blätter bewirken, die zu geringerer Wurzel- und Beute führen kann ([Jassem, 2000](#)).

Eine vollständige Umweltbilanz des Anbaus herbizidtoleranter Biotechpflanzen muss möglichst alle Emissionen und Belastungsfaktoren eines Produktionszyklus erfassen. Man versucht dem durch den ganzheitlichen Ansatz der LCA-Analyse (life cycle analysis) gerecht zu werden. Eine erste LCA-Analyse des Biotechzuckerrübenanbaus stammt aus Vergleichsdaten von Feldversuchen, die mit gewöhnlichen und glyphosat-toleranten Zuckerrüben an Versuchsstandorten in Großbritannien und Deutschland gewonnen wurden. Dabei ergab sich, dass sowohl an den britischen als auch an den deutschen Versuchsflächen die Biotechproduktion mit deutlich geringeren Umweltbelastungen verbunden ist als die konventionelle Zuckerrübenproduktion (Tab. 27). Der Beitrag einzelner Phasen der industriellen Zuckerrübenproduktion zu den Belastungen ist sehr unterschiedlich. Die Ökoto-

Herbizid	Sprühung nach Auflaufen der Saat			
Nr.	1	2	3	Total
konventionell				
Rebell	1	1	1	3
Goltix WG	1	1	1	3
Betanal Progress OF	0,8	0,8	0,8	2,4
herbizidtolerant				
Glyphosat	2,34	2,34	-	4,68
Tab. 26. Typische Herbizidbehandlung konventioneller und glyphosat-toleranter Zuckerrüben an einem deutschen Standort. Die herbizidtolerante Varietät benötigt weniger Sprühungen, weniger Herbizide und keine mechanische Unkrautentfernung (Bennett u. a., 2004).				

xizität z. B. resultiert nahezu ausschließlich aus dem Ausbringen der Herbizide auf dem Feld. Dagegen werden Boden- und Gewässerversauerung und -düngung größtenteils durch die Herbizidproduktion verursacht, nicht durch die versprühten Herbizide selbst ([Bennett u. a., 2004](#)).

Glufosinat

Die Mehrzahl der heute angebauten herbizidresistenten Biotechpflanzen exprimiert *epsps* von *Agrobacterium tumefaciens* und ist deshalb glyphosattolerant. Es sind jedoch nahezu zeitgleich mit den ersten glyphosattoleranten Ackerpflanzen auch transgene Linien entwickelt und zum Anbau zugelassen worden, welche resistent gegenüber Glufosinat als Wirkstoff enthaltenden Breitbandherbiziden wie Liberty, Basta, Finale u. a. sind. Diese Linien exprimieren eine pilzliche Phosphinothricin-N-Acetyltransferase, welche das Phosphinothricin durch

Kulturtyp	konventionell	glyphosattolerant
Energie [MJ]	330	160
globale Erwärmung [kg CO ₂ -EQ]	67	47
Ozonabbau [kg FCKW-EQ x 10 ⁻⁵]	2,5	1,3
Ökotoxizität [kg Cr-EQ]	18	15
Versauerung [kg-SO ₂ -EQ]	0,68	0,4
Düngung [kg PO ₄ -EQ]	0,026	0,014
Sommersmog [kg NO _x -EQ]	0,18	0,114
Karzinogenität [kg PAH-EQ x 10 ⁻⁶]	4,7	2,5

Tab. 27. Vergleich verschiedener Umweltbelastungsparameter beim Anbau von jeweils 50 t konventioneller und herbizidtoleranter Zuckerrüben an deutschen Versuchsstandorten. MJ Megajoule, EQ Äquivalent, FCKW Fluorchlorkohlenwasserstoffe, Cr Chrom, SO₂, Schwefeldioxid, PO₄ Phosphat, NO_x Stickstoffoxide, PAH polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Bedeutung der Äquivalente: Der Beitrag der Produktion von 50 t Zuckerrüben zur globalen Erwärmung ist derselbe wie bei der Freisetzung von 67 (konventionell) bzw. 47 (herbizidtolerant) kg CO₂ durch einen Verbrennungsprozess. Der damit verbundene Ozonabbau in der Atmosphäre ist ebenso groß wie der, welcher durch Freisetzung von 2,5 x 10⁻⁵ bzw. 2,3 x 10⁻⁵ kg FCKW verursacht wird, usw. ([Bennett u. a., 2004](#)).

Anheftung einer Acetylgruppe unwirksam macht. Auf diesem Resistenzprinzip beruht die Glufosinattoleranz verschiedener transgener Mais- und Rapslinien wie B16 bzw. HCN10 und HCN92. Auch auf Reis und Zuckerrübe ist die Glufosinatresistenz übertragen worden.

Ammoniumglufosinat (Phosphinothricin) ist ein Breitbandkontaktherbizid zur Bekämpfung einer Vielzahl von Gräsern und zweikeimblättrigen Unkräutern ([CERAb](#)). Es ist eine natürlich vorkommende Aminosäure, die erstmals 1994 aus zwei *Streptomyces*-Arten isoliert wurde. Die chemische Struktur des Glufosinats ist derjenigen der Glutaminsäure sehr ähnlich. Deshalb wird es von der Glutaminsynthase wie diese gebunden und hemmt so die Aktivität des Enzyms. Glutaminsynthase katalysiert die Synthese der Aminosäure Glutamin aus Glutaminsäure und Ammoniak. Die Hemmung der Glutaminsynthase durch Ammoniumglufosinat bewirkt eine Erniedrigung des Glutaminpegels und gleichzeitig die Akkumulierung von Ammoniak in der Pflanzenzelle, welches in höheren Konzentrationen toxisch wirkt. Die Pflanze stellt die Proteinsynthese ein, und die Photosynthese kommt zum Erliegen. Nach wenigen Tagen stirbt die Pflanze ab.

Glufosinat hemmt nicht nur die pflanzliche Glutaminsynthase, sondern auch die der Tiere. In höheren Dosen ist die Verbindung deshalb nicht nur für Pflanzen giftig, sondern auch für Säuger. Am empfindlichsten scheinen

Hunde zu reagieren, bei denen bereits nach Verabreichung geringer Dosen eine Verringerung des Glutaminsäurepegels im Herzmuskel beobachtet wird. Die LD50, die Dosis, bei der 50% der Tiere einer Population getötet werden, ist stark artabhängig. Bei Ratten beträgt sie 1500 - 2000 mg/kg Körpergewicht, bei Hunden nur 1/6 davon. Die Weltgesundheitsorganisation kennt 4 Toxizitätsklassen (Ia, Ib, II, III) von extrem (Ia) bis leicht (III) gesundheitsgefährdend und hat Glufosinat in die Gruppe III eingestuft. Manche der vor der Einführung glyphosatoleranter Biotechsojasorten in größerem Umfang eingesetzten Herbizide sind wesentlich giftiger. So gehören 2,4-D, Metribuzin und Paraquat in die WHO-Gefährdungsklasse II.

Erstmals ist Glufosinat 1984 in Japan als Herbizid eingesetzt worden. Inzwischen wird es in mehr als 40 Ländern unter verschiedenen Handelsbezeichnungen wie Basta, Rely, Finale und Liberty eingesetzt. Glufosinat ist gut wasserlöslich und kann deshalb leicht aus dem Boden ausgewaschen werden und dann ins Grundwasser gelangen. In der Umwelt wird es ziemlich rasch zu natürlich vorkommenden Verbindungen wie Phosphorsäure, Kohlendioxid und Wasser abgebaut. Die Halbwertszeit im Boden beträgt im Mittel etwa 40 Tage.

Der Bodenpilz *Streptomyces viridochromogenes* bildet eine Phosphinothricinacetyltransferase (PAT), welche das Glufosinat durch Anheftung einer Acetylgruppe in eine ungiftige Verbindung umwandelt, welche die Glutaminsynthase nicht mehr zu hemmen vermag. Der Pilz kommt überall im Boden vor. Er ist mit *Streptomyces griseus* verwandt, aus dem das Antibiotikum Streptomycin gewonnen wird. *Streptomyces viridochromogenes* besitzt eine leichte antimikrobielle Wirkung und wird durch Streptomycin im Wachstum gehemmt. Schadwirkungen des Pilzes auf Menschen, Tiere oder Pflanzen sind nicht bekannt. Transgene Pflanzen, welche das PAT-Protein exprimieren, können Glufosinat durch Acetylierung entgiften und überleben so die Herbizidbehandlung.

Wie in den USA und Kanada durchgeführte Feldversuche ergeben haben, hat der Anbau glufosinattoleranter A2704-12-Sojabohnen keine negativen Auswirkungen auf die Begleitfauna und -flora des Agrarökosystems. Deshalb ist zu erwarten, dass der kommerzielle Anbau von Liberty-Sojabohnen die Umweltbilanz der Sojaproduktion ebenso günstig beeinflussen wird, wie die Einführung der glyphosatoleranten Sorten. Er wird zwar eine vermehrte Anwendung von Glufosinatherbiziden mit sich bringen, die aber dadurch mehr als wettgemacht wird, dass zahlreiche andere das Ökosystem stärker belastende Herbizide nicht mehr benötigt werden und sich die Zahl der pro Vegetationsperiode nötigen Spritzungen wesentlich reduziert.

8.2.2.2 Resistenzentwicklung

Bereits in den frühen siebziger Jahren kannte man gegen Atrazin, Paraquat und eine Reihe anderer Herbizide resistente Unkräuter. Man findet sie in allen Weltgegenden. Mittlerweile werden auch immer mehr glyphosatresistente Unkräuter beschrieben ([Sander mann, 2006](#)). Im Jahre 1987 wurden mehrere glyphosatresistente Biotypen (Rassen) der Ackerwinde (*Convolvulus arvensis*) entdeckt, die bis zu 4mal toleranter als die Normalform sind ([Duncan und Weller, 1987](#)). In Australien fand man eine glyphosatresistente Form des Steifen Weidelgrases (*Lolium rigidum*; [Heap, 1997](#)), in Malaysia eine solche der Indischen Eleusine (*Eleusine indica*), eines typischen Ungrases der Tropen und Subtropen ([Lee & Ngim, 2000](#)). 2001 isolierte man in den USA eine Rasse des Kanadischen Berufkrauts (*Conyza canadensis*), welche eine 8 - 13mal höhere Glyphosatoleranz besitzt als der sensitive Biotyp ([VanGessel, 2001](#)). Glyphosatresistente *Conyza*-Biotypen sind inzwischen in den USA stark verbreitet. *Conyza canadensis* steht dort auf der Liste der 10 wirtschaftlich wichtigsten Unkräuter und kommt eingeschleppt auch in Deutschland vor. Im Gegensatz zum Glyphosat ist beim Glufosinat bisher keine natürliche Resistenzentwicklung beobachtet worden.

Herbizidresistente Individuen tragen Mutationen in Genen, welche direkt oder indirekt im Wirkungsmechanismus des Herbizids eine Rolle spielen. Manchmal genügt eine Punktmutation in einem einzelnen Gen, um die Resistenz hervorzurufen. Der Mais z. B. besitzt eine natürliche Resistenz gegen das früher viel verwendete in Deutschland nicht mehr zugelassene Atrazin. Ihre Ursache ist eine Punktmutation in einem Gen, welches ein funktionsnotwendiges Protein des pflanzlichen Photosyntheseapparates kodiert. Die Mutation bewirkt, dass das Atrazin nicht mehr an seinen Wirkungsort gebunden wird und deshalb Photosynthese und Wachstum nicht mehr blockieren kann.

Die Glyphosatresistenz der Monsanto-Maislinie MON-603-6 (Synonym NK603) und der von dieser Sorte abstammenden glyphosatresistenten Biotechmaislinien beruht auf der Expression einer glyphosatunempfindlichen Form der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS), die ursprünglich aus *Agrobacterium tumefaciens* stammt. Als Ursache der natürlichen Glyphosatresistenz von Unkräutern wurde dieses Wirkungs-

prinzip bisher nur bei *Eleusine indica* gefunden. Die EPSPS des resistenten *Eleusine*-Biotyps ist etwa 5mal unempfindlicher gegen Glyphosat als die des sensitiven. Sequenzvergleiche der beiden EPSP-Synthasen zeigen 4 Nukleotidsubstitutionen, von denen zwei den Austausch einer Aminosäure bewirken. Eine dieser Mutationen, eine Prolin/Serin-Substitution an der Position 106 der Peptidkette, entspricht einer Mutation, die bereits früher in einer glyphosatunempfindlichen EPSPS des Bakteriums *Salmonella typhimurium* gefunden wurde. Die zweite Mutation trägt wahrscheinlich nicht zur Glyphosatunempfindlichkeit der veränderten EPSP-Synthase bei (Baerson u. a., 2002).

Völlig verschieden von diesem Glyphosatresistenzmechanismus ist der des Steifen Weidelgrases. Dieser beruht höchstwahrscheinlich auf einer Störung des Transports von Glyphosat in die Chloroplasten, wo sein Wirkungsort ist. Da verschiedene weitere Studien an glyphosatresistenten Unkräutern ebenfalls auf eine Reduzierung des Glyphosattransports in die Chloroplasten hinweisen, bildet dieser Mechanismus möglicherweise eine Hauptursache der natürlichen Glyphosatresistenz. Man kennt heute weit über 200 herbizidresistente Unkrautbiotypen aus vielen Ländern, die mindestens 17 verschiedene Wirkungsmechanismen haben. Im Prinzip kann die Resistenz bei jedem Schritt entstehen, der auf die Wirkung eines Herbizids einen Einfluss hat: der Aufnahme des Wirkstoffs in die Pflanzenzelle, dem Transport an seinen Wirkungsort innerhalb der Zelle, der Bindung des Wirkstoffs an sein Zielprotein oder seiner Entgiftung durch pflanzeigene Enzyme.

Ursachen der Resistenzentwicklung

Die Risikodiskussion zur Evolution resistenter Unkräuter als Folge des Anbaus herbizidresistenter Biotechpflanzen ist stark von der Vorstellung geprägt, dass Resistenztransgene durch Pollenflug von Biotechpflanzen auf ihre wilden Verwandten übertragen werden. Wie die Beispiele zeigen, kann Herbizidresistenz in Wildpflanzen auch spontan entstehen. Unkrautpopulationen sind in der Regel genetisch heterogen und können, selbst wenn sie insgesamt herbizidsensitiv sind, Individuen enthalten, die eine natürliche, durch spontane Mutationen entstandene, Herbizidresistenz besitzen. Normalerweise ist diese von einer Wachstumsschwäche begleitet, so dass sich die resistente Population in der Pflanzengesellschaft nicht durchsetzen kann. Anhaltender Selektionsdruck infolge langjähriger regelmäßiger Herbizidanwendung kann dazu führen, dass sich dieser Nachteil in einen Selektionsvorteil verwandelt, wodurch die ursprünglich kleine herbizidresistente Subpopulation immer dominanter wird.

Fast ohne Ausnahme sind die beschriebenen glyphosatresistenten Unkrautbiotypen in Agrarbiotopen mit langjähriger Glyphosatanwendung aufgefunden worden. Dies heißt nicht, dass die ihnen zugrunde liegenden Mutationen durch Glyphosat, das keine nachweisbaren mutagenen Wirkungen hat, verursacht wurden. Resistenzmutanten können bereits vor der Glyphosatanwendung in der Unkrautpopulation vorhanden gewesen sein. Der Glyphosateinsatz schafft dann lediglich bessere Bedingungen für ihre selektive Vermehrung, indem er die sensitive Population in ihrem Wachstum hemmt.

Die Evolution gegen die modernen Totalherbizide wie Glyphosat resistenter Unkräuter wurde lange für sehr unwahrscheinlich gehalten, da sie ursprünglich nur vereinzelt nach langjähriger extensiver Glyphosatanwendung beobachtet wurde und die Selektion resistenter Individuen unter Glyphosatselektionsdruck bei Mutagenisierungsversuchen im Labor nur äußerst selten gelingt. Was die Evolution resistenter Unkräuter angeht, galt Glyphosat deshalb bisher als Herbizid mit geringem Risiko. Inzwischen sind in manchen Staaten der USA glyphosatresistente Unkrautbiotypen so stark verbreitet, dass sie ohne Gegenmaßnahmen voraussichtlich schon in wenigen Jahren zu einer ernsthaften Bedrohung des Anbaus glyphosatresistenter Biotechpflanzen werden dürften, die gegenwärtig die am weitesten verbreiteten transgenen Ackerpflanzen sind.

Gegenmaßnahmen

Verhindern lässt sich die Selektion gegen die modernen Totalherbizide resistenter Unkrautbiotypen angesichts des Umfangs, in dem erstere heute zum Einsatz kommen, nicht. Sie kann aber wesentlich verlangsamt werden, wenn man sie mit anderen Unkrautbekämpfungsmaßnahmen kombiniert (Rotationspflanzung glyphosatresistenter und konventioneller Sorten, Verwendung verschiedener Herbizide und/oder Biotechsorten im Wechsel, mechanische Unkrautbekämpfung). Vom Hersteller des Roundup-Ready-Saatguts und ebenso von akademischen Institutionen wird dieses Vorgehen bereits seit Jahren empfohlen.

Die gegenwärtig vermarkteten herbizidresistenten Biotechpflanzen reflektieren den vor mehr als 20 Jahren in der pflanzenphysiologischen Grundlagenforschung erreichten Erkenntnisstand und stellen sicher nicht den Endpunkt der Entwicklung dar. Langfristig muss es das Ziel der Pflanzenzüchtung sein, Kulturpflanzen zu entwickeln, die

sich gegen Unkräuter selbst verteidigen können und keine Herbizide mehr benötigen, sei es infolge höherer Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten, Schädlinge und andere Stressfaktoren, besserer Ausnutzung des Lichts, Wassers oder Nährstoffangebots, der Ausscheidung von allelopathischen (Konkurrenten im Wachstum hemmenden) Verbindungen, vielleicht aber auch mithilfe ganz anderer, noch zu entdeckender biochemischer Mechanismen.

8.2.3 Pflanzliche Bt-Toxine

8.2.3.1 Umweltverträglichkeit

Insektenresistente Biotechpflanzen bilden geringe Mengen eines oder mehrerer Endotoxine, deren Gene ursprünglich aus dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* stammen. Diese Proteine werden seit Jahrzehnten in der biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt. Bt-Präparate werden als wasserdispergierbare Granulate oder Suspensionskonzentrate in den Handel gebracht, welche die Sporen des Bakteriums und die kristallinen Proteintoxine enthalten. Die langjährige Anwendung von Bt-Präparaten und die darüber existierende Literatur lassen keinen anderen Schluss zu als den, dass das bakterielle Bt-Toxin für Menschen, andere Wirbeltiere und die meisten Insekten ungiftig ist. Ebenso wie die Wirkung des bakteriellen Toxins wurde auch diejenige des von transgenen Pflanzen gebildeten vielfach untersucht, indem das aus Blättern extrahierte Protein, Blattgewebe oder Pollen von MON810 und anderen Bt-Pflanzen z. T. in sehr hohen Dosen an zahlreiche Wirbellose und Wirbeltiere verfüttert wurde, z. B. an Insekten, Bienenlarven und Bienen, Flurfliegen, parasitische Schlupfwespen, Marienkäfer, Wasserflöhe, Regenwürmer, Springschwänze, Kleinkrebse, Vögel und Mäuse. Insgesamt haben diese Studien ergeben, dass pflanzliche Bt-Toxine ebenso ungefährlich sind wie die von Bakterien und dass der Anbau von Bt-Mais keinerlei negativen Auswirkungen auf die in Agrarökosystemen lebenden Organismen hat und selbst für bedrohte Arten keine Gefahr darstellt. Das gegen den Maiszünsler wirkende Cry1Ab ist nur für Schmetterlinge giftig, Cry3Bb1, das gegen den Maiswurzelbohrer wirkt, nur für Chrysomeliden. In den USA, wo bisher die meisten Freilanduntersuchungen durchgeführt wurden, stehen weder Vertreter dieser Familien auf der Liste bedrohter Arten, noch überlappen die Habitate bedrohter gegen Bt-Toxine empfindlicher Arten mit Maisfeldern. Auch wasserlebende Käfer sind nicht gefährdet, da die - etwa durch Polleneintrag - erzeugte Bt-Toxinbelastung des Wassers mehrere Größenordnungen unter der Toxizitätsschwelle für Insekten liegt.

Einen ökologisch wie umweltpolitisch interessanten Sonderfall bildet der in den USA unter Naturschutz stehende dem einheimischen Distelfalter ähnelnde Monarchschmetterling (*Danaus plexippus*). Seine Raupen ernähren sich ausschließlich von Milkweedpflanzen (*Asclepias spec.*). Sie kommen in den USA auf Äckern, Wiesen, Wegrändern und auch an oder in Maisfeldern vor. Monarchlarven können geschädigt werden, wenn sie Pollen der Bt-Maissorten Ev176, Bt16 oder MON810 fressen ([Losey u. a., 1999](#); [Stanley-Horn u. a., 2001](#)). Die Schädigung betrifft im wesentlichen das erste der drei Larvenstadien. Ihr Ausmaß ist abhängig von der aufgenommenen Dosis und der bei den drei Sorten unterschiedlichen Cry1Ab-Konzentration im Pollenkorn. Die ersten Ergebnisse fanden erhebliches Interesse bei den Medien, wurden von Umweltaktivisten bald aufgegriffen und lösten eine Serie weiterer ökologischer Untersuchungen aus, die insgesamt zeigen, dass der kommerzielle großflächige Bt-Maisbau kein signifikantes Risiko für die Monarchpopulation darstellt ([Gatehouse u. a., 2002](#)). Sie zeigen auch, dass die in konventionellen Maisfeldern übliche Bekämpfung des Maiszünslers mit λ -Cyhalothrin und anderen Pyrethroiden für den Monarch eine weit größere Gefahr darstellt als die Bt-Toxine. Pyrethroide sind gesundheitsschädlich, bienengefährlich, für wasserlebende Organismen sehr giftig und töten die Monarchraupen innerhalb weniger Stunden.

Die Bt-Toxine werden in der Umwelt schnell abgebaut. Von Pflanzen gebildetes Cry1Ab besitzt im Freiland nach 2 Tagen noch die Hälfte, nach 15 Tagen noch 10% seiner biologischen Aktivität. In zahlreichen Freilandversuchen wurden in Maisfeldern anzutreffende Lebensgemeinschaften harmloser Arthropoden (Gliederfüßler - dazu gehören Insekten, Spinnen und einige andere Gruppen wirbelloser Tiere) in Feldern analysiert und verglichen, in denen Maisinzuchtlinien, Maishybriden oder Bt-Mais angebaut worden war. Dabei zeigte sich, dass Bt-Toxine weder unmittelbare noch mittelbare negative Auswirkungen auf diese Lebensgemeinschaften haben. In Feldern, wo MON863-Mais angebaut wird, sind die Populationsdichten harmloser Insektengattungen gewöhnlich sogar höher als in konventionellen Feldern. Hauptursache ist die niedrigere Zahl der Behandlungen mit unspezifischen Insektiziden ([EPA, 2005](#)).

Die Umweltverträglichkeit von EV176 war Gegenstand einer 6-jährigen von der spanischen Regierung geförderten Feldevaluation, die den 1998 in Spanien begonnenen Feldanbau von Bt-Mais begleitete ([Eizaguirre u. a., 2006](#)). Hauptgegenstand dieser Untersuchung war die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung bei dem

Maiszünsler *Sesamia nonagrioides* und einer Schädigung von Nichtzielorganismen. Weder für das eine noch für das andere haben sich hierbei konkrete Anhaltspunkte finden lassen. Der transgene Bt-Mais hat keine negativen Auswirkungen auf Nichtzielorganismen im Feld. Manche Arten (Blattläuse, Grashüpfer) sind im Bt-Maisfeld stärker vertreten, andere (Raupe, Drahtwürmer) haben die gleiche Populationsdichte wie im konventionellen Maisfeld. Auch die Populationsdichten der häufigsten Gliederfüßler (Raubwanzen, Marienkäfer, Laufkäfer, Spinnen), die pflanzenfressende Insekten jagen, unterscheiden sich in transgenen und konventionellen Maisfeldern nicht. Somit bestätigt auch diese Studie, was praktisch alle zur Umweltverträglichkeit von Bt-Mais vorliegenden Freilanduntersuchungen ergeben haben.

Ganz im Gegensatz zu den Bt-Toxinen sind die gängigen chemischen Insektizide, besonders diejenigen, welche zur Bekämpfung des Maiswurzelbohrers eingesetzt werden, mehr oder weniger starke Umweltgifte. In den USA sind 15 Produkte als toxisch gekennzeichnet, 6 als stark toxisch, eines als sehr stark toxisch und 4 als extrem toxisch für Vögel, Fische und andere Wildtiere. Carbofuran, Phorat und Methylparathion gehören zu den giftigsten Insektiziden überhaupt und werden alle drei zur Bekämpfung der Maiswurzelbohrer eingesetzt. Die Hoffnung, Insektenschädlinge im Maisfeld durch die Entwicklung der Bt-Maislinien wirksam bekämpfen und gleichzeitig den Einsatz von chemischen Insektiziden verringern zu können, hat sich inzwischen zum guten Teil erfüllt. *cry1Ab* in MON810 und anderen Bt-Maislinien gewährt einen nahezu vollständigen Schutz gegen die Maiszünsler (Abb. 78) und einen partiellen Schutz gegen einige verwandte Schädlinge. Die Erträge verbessern sich durch den Anbau von Bt-Mais um ca. 5%. Die gleichzeitig erzielte Einsparung von Insektizidwirkstoffen wird in den USA für das Jahr 2004 auf ca. 2300 Tonnen, weltweit auf ca. 10'700 t geschätzt. Nach Schätzungen der amerikanischen Umweltbehörde haben sich in den USA die mit chemischen Insektiziden zur Bekämpfung des Maiswurzelbohrers behandelten Flächen bis zum Jahre 2007 um insgesamt 2,8 Mio. ha (7 Millionen acres) reduzieren lassen. Hinzu kommt eine wesentlich geringere Belastung der Ernte mit Mykotoxinen, da die durch Pilze verursachten Sekundärinfektionen, die in befallenen Flächen häufig vorkommen, vermieden werden. *In summa* bewirkt dies für die Maisproduzenten eine Verbesserung der Erträge um ca. 5% in den gemäßigten und bis 10% in tropischen und subtropischen Zonen bei gleichzeitiger Senkung der Produktionskosten und



Abb. 78. Erste Bt-Maisernte auf den Philippinen; Mindanao 2003. Bekämpfung des asiatischen Maiszünslers mit Bt-Mais. Links: konventioneller Mais; rechts: Bt-Mais (C. James, 2015).

Verbesserung der Produktqualität. Parallel dazu führt der reduzierte Einsatz von chemischen Insektiziden zu einer geringeren Schädigung der harmlosen Fauna und zu einer geringeren Pestizidbelastung des Bodens, des Grundwassers und der im Maisanbau beschäftigten Landarbeiter. In dem erwähnten EPA-Gutachten aus dem Jahre 2005 heißt es zur Umweltverträglichkeit von MON 863 Mais, dass „...die Benutzung dieses Pestizids im öffentlichen Interesse liegt und während der Dauer der Zulassung keinerlei nachteiligen Auswirkungen auf die Umwelt zu erwarten sind“). Wegen seiner offenkundigen Vorteile wurde der Bt-Mais in Ländern, wo die Maisbauern nicht befürchten müssen, dass ihre Saaten regelmäßig nachts von Unbekannten zertrampelt oder - wie in der Osternacht 2006 bei Fürstenfeldbruck - mit Mineralöl übergossen werden, seit seiner Einführung im Jahre 1996 rasch akzeptiert.

Bt-Baumwolle hat sich als äußerst wirksames Mittel zur Bekämpfung des Baumwollkapselbohrers und verwandter Schmetterlinge erwiesen. Ihr Anbau eliminiert die Notwendigkeit, große Mengen von Breitband-insektiziden einzusetzen, um Schadschmetterlinge abzutöten, von denen mehrere bereits Resistenzen

gegen Pyrethroide und andere chemische Insektizide entwickelt haben. Dies schont die harmlose Insektenfauna und ermöglicht eine Schädlingsbekämpfung mit weniger Insektiziden. Chinesische Baumwollbauern konnten den Pestizideinsatz in den ersten drei Jahren nach Einführung des Bt-Baumwollanbaus um mehr als 70% verringern und erzielten dadurch trotz des 2-3-fach höheren Preises des Bt-Saatguts Einkommensverbesserungen von ca. 36%. Andere Länder machten ähnliche Erfahrungen. Indische Baumwollbauern konnten die versprühten Insektizidmengen durch den Anbau von Bt-Baumwolle um 39% verringern, argentinische um 47%, mexikanische um 77% und südafrikanische um 58%. Auf australischen Baumwollfeldern war der Insektizidverbrauch bei Anbau von Bollgard-Baumwolle um 44% und bei dem von Bollgard II um 87% niedri-

ger als der auf konventionellen Baumwollkulturen ([Downes u. a., 2007](#)). Negative Effekte der Bt-Baumwollsorten auf Nichtzielorganismen wie Bienen, Marienkäfer, Flurfliegen und anderen wurden nicht festgestellt.

8.2.3.2 Resistenzentwicklung

Der ausgiebige Einsatz von Antibiotika in der Humanmedizin und ihre massive Verwendung zur Leistungssteigerung im Tierfutter haben zur Selektion vielfach resistenter Pathogene geführt, die mit den ursprünglich wirksamen Antibiotika nicht mehr bekämpft werden können. Auch führte die jahrzehntelange ausgiebige Verwendung chemischer Pestizide verschiedentlich zum Auftreten unempfindlicher Schädlingspopulationen. Das Aufkommen gegen die δ -Toxine von *Bacillus thuringiensis* resistenter Schädlinge ist deshalb eine ernstzunehmende Gefahr.

Man kennt viele im Labor selektierte Bt-resistente Stämme ursprünglich empfindlicher Zielinsekten. *Helicoverpa armigera*, der bedeutendste Baumwollschädling Australiens, Indiens und Chinas, entwickelt sehr schnell Resistenzen gegen verschiedene konventionelle Insektizide. Bei dieser Art gibt es mehrere Stämme mit Resistenz gegen Cry2Ab und mindestens einen Stamm mit hoher Resistenz gegen Cry1Ac ([Downes u. a., 2007](#)). Bei *Plutella xylostella*, einem ebenfalls zu den Noctuiden gehörenden Schadschmetterling, kennt man Populationen, die gegen Bt-Sprühungen, nicht aber gegen von den Pflanzen selbst gebildete Bt-Toxine, unempfindlich sind. Nach Beobachtungen von [Tabashnik u. a. \(2008a\)](#) hat die ausgedehnte Anwendung von Bt-Baumwolle im Baumwollgürtel der USA eine substantielle Zunahme der Frequenz von Resistenzallelen bei *Helicoverpa zea* bewirkt. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wird noch diskutiert ([Moar u. a., 2008](#); [Tabashnik u. a., 2008b](#)). Sicher ist, dass *Spodoptera frugiperda* in Puerto Rico bonitätsmindernde Feldresistenzen gegen Cry1F exprimierende Bt-Maiskulturen entwickelt hat ([Moar u. a., 2008](#)). Auf mittlere und lange Sicht stellt die Resistenzentwicklung gegen Bt-Toxine eine ernstzunehmende Bedrohung des Bt-Pflanzenanbaus dar. Dies ist einer der Gründe, warum intensiv an der Aufklärung der molekularen Resistenzmechanismen der Zielinsekten gearbeitet wird.

In Australien wird die Resistenzentwicklung in Bt-Baumwollfeldern ständig überwacht, indem man Insekten und auf den Pflanzen abgelegte Eier sammelt. Schmetterlinge und aus den Eiern geschlüpfte Larven werden im Labor mit Bt-Pflanzenmaterial gefüttert. Wenn resistente Individuen gefunden werden, züchtet man diese nach einem bestimmten Schema weiter, bis schließlich Nachkommen gefunden werden, die reinerbig (homozygot) für bestimmte Resistenzallele sind. Da das Sammeln, Testen und Weiterzüchten resistenter Insekten zeitaufwendig ist, werden DNA-Test entwickelt, mit denen man bereits bekannte Bt-Resistenzallele in Feldpopulationen rasch und zuverlässig erkennen kann. Für die Identifizierung neuer, noch unbekannter Resistenzen bleibt man aber auf die klassischen Methoden angewiesen.

Zwischen 2002 und 2006 fand man in australischen Bt-Baumwollfeldern erstmals gegen Cry2Ab resistente Individuen von *Helicoverpa armigera*. Die Resistenzallele müssen in den *Helicoverpa-armigera*-Populationen schon vor der Einführung des Bt-Baumwollanbaus vorhanden gewesen sein, da der Bollgard-II-Anbau erst 2004 eingeführt wurde und die Vorläufersorte Bollgard Cry2Ab nicht exprimiert, ihr Anbau also keinen Selektionsdruck zugunsten der Entstehung gegen das Toxin resistenter Schmetterlinge erzeugen kann. Bisher kennt man mindestens 7 Allele mit Resistenz gegen Cry2Ab, die alle gegen Cry1Ac empfindlich sind. Es gibt noch keine Anzeichen dafür, dass die Häufigkeit der Resistenz verleihenden Cry2Ab-Allele in Bt-Pflanzenkulturen zunimmt.

Die Geschwindigkeit, mit welcher sich gegen Bt-Toxine resistente Schädlinge ausbreiten können, hängt von mehreren Faktoren ab: 1. Eine resistente Population wird desto schneller wachsen, je höher die Genfrequenz der Resistenzallele in der Population bei Einsetzen des Selektionsdrucks ist. Die Frequenz der Cry2Ab-Resistenzallele australischer *Helicoverpa-armigera*-Populationen liegt gegenwärtig bei 0,33%. 2. Partiiell oder vollständig rezessive Resistenzallele breiten sich wesentlich langsamer aus als dominante. So kann aus den Mendelschen Regeln abgeleitet werden, dass vollständig rezessive Resistenzallele in der zweiten Filialgeneration (F_2) 6,25% (1/16) resistente (homozygot rezessive) und dominante Resistenzallele 43,7% (7/16) resistente Nachkommen liefern, falls nur ein Kreuzungspartner der Elterngeneration ein Resistenzallel trägt. Die bisher genetisch untersuchten Cry2Ab-Resistenzen von *H. armigera* vererben sich durchweg rezessiv. 3. Eine vorgegebene Anzahl von Resistenzallelen, die jeweils an verschiedenen Loci liegen, bewirkt eine wesentlich langsamere Resistenzentwicklung als die gleiche Zahl von Allelen an nur einem Locus. Bei 10 Resistenzallelen an 10 verschiedenen Loci ist die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens homozygoter Individuen 100mal kleiner als bei 10 Mutationen im gleichen Gen. Die Sichtung der Nachkommenschaft reziproker Kreuzungen, welche mit

Feldisolaten resistenter *Helicoverpa-armigera*-Individuen durchgeführt wurden, zeigt, dass alle bisher untersuchten Resistenzallele am gleichen Locus liegen. 4. Resistenzen gegen Biotechsorten, welche mehr als ein Bt-Toxin bilden, können sich nur langsam entwickeln, da zwei Resistenzallele im gleichen Individuum zusammenkommen müssen, damit doppelte oder mehrfache Resistenz entsteht. Besonders gilt dies, wenn die Resistenzallele an verschiedenen Loci liegen und in der Nachkommenschaft unabhängig voneinander segregieren. Bisher kann dies nicht geprüft werden, da gegen Cry1Ac resistente Individuen nur gelegentlich gefunden wurden. Man muss jedoch davon ausgehen, dass in Feldpopulationen von *Helicoverpa armigera* gegen Cry1Ac resistente Genotypen mit geringer Frequenz vorkommen ([Mahon u. a., 2008](#)).

Obwohl der molekulare Wirkungsmechanismus der Bt-Toxine ziemlich gut verstanden ist, steht man bei der Aufklärung der Mechanismen, nach denen Schmetterlinge Resistenzen dagegen erworben haben, noch ganz am Anfang. Die Cry1A-Resistenzen der Noctuiden haben eine komplexe genetische Basis, wobei mindestens vier verschiedene Resistenzgene beteiligt sind, die auf verschiedene Weise wirken. Der verbreitetste Resistenztyp bewirkt eine stark reduzierte Bindung des Cry1A-Toxins, wobei die Kreuzresistenz gegen Cry1C vernachlässigbar ist. Die Resistenz wird rezessiv vererbt und entsteht durch Mutationen eines Membranproteins, des Cadherins, welches im Mitteldarmepithel der Larven gebildet wird. Alle Mutationen unterbrechen die Aminosäuresequenz des Proteins und verhindern dadurch dessen normale Lokalisierung in der Zellmembran. Wahrscheinlich entfernen sie den Teil der Peptidkette, welcher die Andockstelle für das Cry1A-Toxin bildet ([Heckel u. a., 2007](#)). Über den molekularen Resistenzmechanismus von Cry2Ab in *Helicoverpa armigera* ist nichts bekannt.

Die Empfindlichkeit des Tabakswärmers (*Manduca sexta*), eines mit *Helicoverpa armigera* entfernt verwandten Schmetterlings, gegen Cry1Ab wird deutlich verringert, wenn das Cadherin durch RNA-Interferenz stillgelegt wird. Rekombinierte Bt-Toxine, deren Peptidkette eine α -Helix fehlt, töten die cadherin-stillgelegten *Manduca-sexta*-Raupen. Ebenso töten sie Bt-resistente Stämme von *Pectinophora gossypiella*, welche Deletionsmutanten im Cadherin tragen. Diese Beobachtungen unterstreichen nicht nur die Bedeutung des Cadherins für die Giftigkeit der Bt-Toxine; sie lassen auch erwarten, dass mit modifizierten Bt-Toxinen eine erfolgreiche Bekämpfung gegen die Standardtoxine resistent gewordener Schädlinge möglich ist ([Soberón u. a., 2007](#)).

8.2.3.3 Refugien

Im Jahre 2000 wurde von der amerikanischen Umweltschutzbehörde (EPA) das Konzept der Refugien (Rückzugsflächen) eingeführt, um die Entwicklung resistenter Maiszünslerpopulationen zu verhindern oder aufzuhalten, die infolge der raschen Ausdehnung des Bt-Maisanbaus befürchtet wurde. Bt-Farmer wurden dadurch verpflichtet, 20% ihrer Flächen mit konventionellen Sorten zu bepflanzen. Der Zweck der Reservate ist es, eine Population von Maiszünslern zu erhalten, die nicht dem Bt-Toxin ausgesetzt ist und sich mit potentiell resistenten Schmetterlingen paaren kann, die aus den Bt-Feldern stammen. Auf jeden resistenten Schmetterling sollte so ein Vielfaches nicht resistenter Individuen kommen und dadurch die Verbreitung des Resistenzgens verzögern. Die Verpflichtung, Refugien einzurichten, gilt auch für Biotechbaumwolle einschließlich von Stapelsorten wie Bollgard II, obwohl bei diesen die Gefahr der Resistenzentwicklung geringer eingeschätzt wird.

In Australien wurde bereits Mitte der 90er Jahre mit der Einführung der ersten Bollgard-Baumwolle ein Resistenzmanagement eingeführt, welches dem Zweck dienen sollte, die Entwicklung Bt-resistenter Populationen von *H. armigera* wenigstens solange hinauszuzögern, bis die verbesserte Sorte Bollgard II für den Feldanbau verfügbar war. Die einschneidendste Maßnahme dieses Resistenzmanagements war die Beschränkung des Biotechbaumwollanbaus auf 30% der Baumwollanbaufläche für jede Farm. Die restlichen 70% mussten mit konventioneller Baumwolle bestellt werden und bildeten ein Refugium für die Schädlinge. Für den in der Saison 2004/2005 begonnenen Bollgard-II-Anbau Australiens wurde diese Vorschrift gelockert, und die Farmer durften 95% ihrer Baumwollflächen mit Bollgard II bestellen. Dies geschah in der Erwartung, dass die Resistenzgene für die beiden Bt-Toxine unabhängig voneinander segregieren und die rasche Etablierung gegen beide Toxine resistenter Populationen dadurch unwahrscheinlich wird.

Die Einrichtung von Refugien ist eine Vorsichtsmaßnahme, deren Wirksamkeit bisher nicht klar bewiesen werden kann ([Eizaguirre u. a., 2006](#)). Eine systematische Evolutionsstudie zur Resistenzentwicklung des Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera*) kam zu dem Ergebnis, dass Refugien nur begrenzte Wirkung haben. In Abwesenheit von Refugien entwickelt der Käfer in Bt-Maisfeldern nach 3 Generationen Resistenz gegen das Cry34/35Ab1-Toxin. Wenn Refugien eingerichtet werden, ist die Resistenzentwicklung in manchen Fällen

verzögert. Die Käfer werden aber auch dann gegen das Bt-Gift unempfindlicher ([Deitloff u. a., 2015](#)). Man kennt inzwischen zahlreiche natürliche und synthetische Bt-Toxine mit deutlich verschiedenem Wirkungsspektrum, und ständig kommen weitere dazu. Erfolgversprechender ist deshalb vermutlich eine Strategie, die darauf abzielt, gegen ein Cry-Toxin resistent gewordene Schmetterlings- oder Käferpopulationen, sollten sie auftreten, durch Anbau neuer Biotechlinien zu bekämpfen, welche mehrere Toxine bilden, oder solche, die auch gegen die resistenten Populationen wirksam sind. Man kann es als Erfolg dieses Resistenzmanagements deuten, dass ein Feldversagen von Bt-Biotechpflanzen infolge der Evolution resistenter Schädlinge bisher abgesehen von dem erwähnten Fall in Puerto Rico nirgends aufgetreten ist.

Mit mathematischen Simulationsmodellen lässt sich die Frage behandeln, ob der für Einrichtung und Pflege der Rückzugsflächen nötige Zusatzaufwand ökologisch und wirtschaftlich zu rechtfertigen ist. Modellrechnungen zeigen, dass selbst dann, wenn die Rückzugsfläche 60% der gesamten Anbaufläche ausmacht, der Pestizidverbrauch insgesamt geringer ist als beim konventionellen Baumwollanbau und der Bt-Farmer trotz des höheren Preises des Bt-Saatguts ein deutlich höheres Nettoeinkommen erzielt als der konventionelle Baumwollfarmer ([Zhao u. a., 2008](#)).

8.2.3.4 Sekundärschädlinge und ihre Bekämpfung

Wie eine 2004 durch Befragung von 481 chinesischen Bt-Baumwollfarmern in 5 verschiedenen Provinzen durchgeführte Erhebung zeigt, sind die im chinesischen Bt-Baumwollanbau verbrauchten Pestizidmengen nach anfänglichem Rückgang wieder stark angestiegen, weil es auf den Bt-Baumwollfeldern zu einem immer stärkeren Befall durch Sekundärschädlinge kommt, die gegen die Bt-Toxine unempfindlich sind. ([Wang u. a., 2008](#)). Unter anderem handelt es sich dabei um Vertreter der Gattungen *Lygus* und *Adelphocoris*, die Pflanzensäfte saugen und zu den Weichwanzen (Familie *Miridae*, Ordnung *Heteroptera*) gehören. Vor Einführung des Bt-Baumwollanbaus haben diese wirtschaftlich kaum eine Rolle gespielt.

Ursprünglich haben die chinesischen Baumwollpflanzer im Mittel 20 Insektizidbehandlungen pro Saison durchgeführt, um den Kapselbohrer zu bekämpfen. Nach der Einführung der Bt-Baumwolle ging die Zahl der Behandlungen in den ersten Jahren auf im Mittel 6,6 zurück. Dies entspricht einer Reduktion um 71%. Im Jahr 2004, 7 Jahre nach der ersten Vermarktung der Bt-Baumwolle, wurden von den befragten Bauern im Mittel 18 Spritzungen pro Saison durchgeführt, fast dreimal soviel wie 1999. Im Jahr 2005 mussten sie bereits ebensoviele Insektizide spritzen wie die Nicht-Bt-Farmer. In diesem Jahr verursachte der zur Bekämpfung des Sekundärbefalls notwendige Zusatzaufwand nicht nur die vollständige Erosion der ursprünglich erzielten Einkommensverbesserungen. Infolge des höheren Preises des Bt-Saatguts erzielten die Bt-Bauern auch ein um 8% niedrigeres Nettoeinkommen als ihre konventionell arbeitenden Kollegen.

Populationsdynamisch betrachtet ist das Überhandnehmen von Sekundärschädlingen eine natürliche Folge der Bt-Technik. Die zur Bekämpfung des Kapselbohrers eingesetzten Insektizide haben im Gegensatz zu dem hochspezifischen Bt-Toxin ein relativ breites Wirkungsspektrum und töten viele Schädlinge ab. Für gegen Bt-Toxine unempfindliche Schadinsekten schafft der Wegfall der Insektizidbehandlung zusammen mit der Ausschaltung ihres wichtigsten Konkurrenten wesentlich bessere Lebensbedingungen, was schließlich dazu führt, dass ihre vormerk kleinen Populationen so stark anwachsen, dass sie eine Gefahr für den Baumwollanbau werden. Mit populationsdynamischen Prozessen vertraute Entomologen schätzen, dass es nach 5 - 10 Jahren in der Regel soweit ist.

Im Unterschied zu den USA und anderen Ländern waren oder sind Chinas Baumwollbauern nicht zur Anlegung von Refugien verpflichtet. Da die beschriebenen Sekundärschäden in diesem Ausmaß bisher nur in China aufgetreten sind, spricht der erste Anschein dafür, dass die Einrichtung von Refugien nicht nur die Resistenzentwicklung, sondern auch die Ausbreitung von Folgeschädlingen zumindest verzögern kann. Ob dies tatsächlich zutrifft, können nur mehrjährige Feldversuche klären. Der wirksamste Weg zu Eliminierung von Folgeschädlingen wäre die Entwicklung modifizierter gegen die Sekundärparasiten gerichteter Bt-Toxine oder anderer selektiv wirkender Toxine, die von den Pflanzen selbst gebildet werden.

8.2.4 Unkrautpotential transgener und konventioneller Ackerpflanzen

Das Unkrautpotential der wichtigen Biotechpflanzen unterscheidet sich nicht von dem ihrer konventionellen Verwandten. Zwar ist es je nach Art unterschiedlich ausgeprägt, die Überlebenschancen ausgewilderter Individuen in der Wildflora sind jedoch gering. So sind nur wenige Fälle bekannt geworden, wo sich kleinere Populationen ausgewilderter Ackerpflanzen in der Wildflora ohne stetige Zufuhr von Samen, die von

kultivierten Ackerflächen stammen, über mehrere Generationen behaupten konnten. Eine 10jährige in Großbritannien durchgeführte Studie verfolgte die Entwicklung konventioneller und transgener Populationen verschiedener Kulturpflanzen an Wildstandorten und fand keine Verbesserung der Konkurrenzfähigkeit der Biotechpflanzen. Nach 4 Jahren fand man keine überlebenden Raps-, Mais-, oder Zuckerrübenpflanzen mehr. Nur einige wenige Kartoffelpflanzen hatten nach 10 Jahren überlebt. Keine von diesen war transgen ([Crawley u. a., 2001](#)). Global gesehen werden die größten Verwilderungsschäden nicht durch einjährige (transgene) Ackerpflanzen verursacht, sondern durch importierte ausdauernde Zier- und Gartenpflanzen mit ausgiebiger sexueller und vegetativer Vermehrung ([Sanvido u. a., 2006](#)).

8.2.4.1 Mais

Am geringsten ist das Unkrautpotential beim Mais. Mais besitzt keine natürlichen Samenverbreitungsmechanismen mehr und ist bei der Vermehrung auf die Hilfe des Menschen angewiesen. In den gemäßigten Breiten überlebt der Mais den Winter nicht. Durch die Transformation mit den Resistenzgenen werden diese Eigenschaften nicht verändert. Biotechmais ist deshalb ebenso wie konventioneller Mais nicht invasiv und kann in Wildpflanzengesellschaften nicht bestehen.

8.2.4.2 Zuckerrübe

Wegen ihrer Frostempfindlichkeit und anderer Merkmale ist die Zuckerrübe kein starker Konkurrent für die wilden Rüben. Auch gibt es bisher keine Anhaltspunkte dafür, dass herbizidresistente Rüben gegenüber den wilden Formen ein gesteigertes Unkrautpotential besitzen, sich in der Wildflora durchsetzen und diese nach und nach verdrängen. Die Herbizidresistenz bildet nur an Standorten einen Selektionsvorteil, wo regelmäßig Herbizide zum Einsatz kommen.

8.2.4.3 Soja

Kultivierte Sojasorten haben keine Unkrauteigenschaften. Ihre Samen zeigen keine ausgeprägte Dormanz, und so wachsen Volontäre in der Folgefrucht nur unter besonderen Umständen. Sie sind überdies mechanisch oder chemisch leicht zu bekämpfen. In Nordamerika findet man die Sojabohne nicht außerhalb der Anbauflächen. In bewirtschafteten Ökosystemen kann die Pflanze weder mit Kulturpflanzen noch mit Wildpflanzen erfolgreich konkurrieren. Ebenso wie bei der Zuckerrübe haben die herbizidtoleranten Sorten an natürlichen Standorten gegenüber den konventionellen Kultivaren keinen Selektionsvorteil.

8.2.4.4 Raps

Auch der Raps hat in der natürlichen Umwelt nur ein geringes Invasionspotential. Die kultivierten Sorten wachsen nur unter den landwirtschaftlichen Anbaubedingungen gut, d. h. bei hoher Bodenfruchtbarkeit, Düngung, Unkrautbekämpfung und guter Wasserversorgung. In natürlichen Habitaten spielt der Kulturraps als Unkraut keine Rolle und wird, sofern der Samen nicht ständig nachgeliefert wird, von den Wildpflanzen vollständig verdrängt. Kleinere oder größere Rapspopulationen findet man dagegen oft auf landwirtschaftlich nicht genutzten Flächen der Kulturlandschaft wie Bahndämmen und Wegrändern in der Umgebung von Rapsfeldern oder entlang der Transportwege zu den Ölmühlen (Abb. 79). An solchen Standorten fand man herbizidresistenten Biotechraps bereits 1995 in Kanada. In Nord-Dakota sind herbizidresistente Biotechrapspopulationen an Straßenrändern verbreitet. Man findet sie etwa an 45% der getesteten Standorte. Die meisten (80%) explizieren 1 Transgen, entweder *cp4-epsps* oder *pat*. 0,7% explizieren beide Gene ([Schafer u. a., 2011](#)). Da Stapelsorten mit doppelter Herbizidresistenz zum Zeitpunkt der Untersuchung im Testgebiet nicht angebaut wurden, müssen diese durch Hybridisierung monotransgener Individuen im Freiland entstanden sein. Die dichtesten Populationen fand man entlang der Transportwege von den Rapsfeldern zu den Ölmühlen. Auch in größerer Entfernung von den Zentren der Biotechrapsproduktion fand man vereinzelt kleinere transgene Populationen. Dies zeigt, dass herbizidresistenter transgener Raps außerhalb der Produktionsflächen wachsen, mit anderen Biotechrapslinien und gewöhnlichem Raps hybridisieren und im Freiland als Samen auch mehrere Jahre überdauern kann, alles Eigenschaften, die auch gewöhnlicher Raps besitzt. Anhaltspunkte für eine mögliche Gefährdung der Wildflora durch die im herbizidresistenten Biotechraps vorhandenen *epsps*- und *pat*-Gene ergaben sich aus diesen Erkenntnissen nicht.

Auf landwirtschaftlich genutzten Flächen kann Raps zu einem Unkraut werden. Infolge von Ernteverlusten oder der Ablösung von Früchten und Samen reifer Pflanzen nach Unwettern können sich im Boden von Rapsfeldern hohe Samenbestände aufbauen, was dann zum unerwünschten Auskeimen einzelner Rapspflanzen (Volontäre, Durchwuchsrap) in der Folgefrucht führt. Solche Volontäre findet man noch 4-5 Jahre nach einer Rapskultur in

der Folgefrucht. Praktisch hat dies keine große Bedeutung. Raps wird oft im Wechsel mit Getreide angebaut, und die im Getreidebau üblichen mechanischen und chemischen Unkrautbekämpfungsmethoden rotten die nach der Rapsernte auskeimende Rapspopulation größtenteils aus, ohne dass Zusatzmaßnahmen erforderlich sind. Die gegenwärtig zugelassenen Biotechrapssorten unterscheiden sich hinsichtlich ihres Invasionspotentials und



Abb. 79. Mischpopulation von Raps und Rüben an einem Ruderalstandort.

Unkraut-verhaltens von konventionellen Canolalinien nicht. Auch hier gilt, dass Herbizidresistenzgene nur an Standorten einen Überlebensvorteil gewähren, wo regelmäßig Herbizide zum Einsatz kommen. Die Linien MS1, RF1 des *barnase/barstar*-Sterilitätssystems und ihre Hybriden haben keine neuen phänotypischen Eigenschaften, welche ihre Ausbreitung jenseits der kultivierten Rapsanbau-flächen begünstigen könnten. Sie sind nicht invasiver als gewöhnlicher Raps und bilden deswegen für die Biodiversität keine Gefahr. Ein Einfluss des erhöhten Laurinsäuregehalts der Lauricat-Biotechrapslinien auf das Unkrautverhalten ist ebenfalls nicht zu erwarten. Laurinsäure bewirkt keinen Wachstumsvorteil, da sie weder die Stress-resistenz noch das Fortpflanzungsverhalten noch irgend-welche anderen Eigenschaften verändert, die mit dem Überleben der Pflanzen in der Wildflora zusammenhängen. So ist die Zahl der Volontäre auf vordem mit Lauricatrapps bestellten Flächen nicht höher als bei konventionellen Rapsfeldern.

8.2.4.5 Baumwolle

Baumwolle wird seit Jahrhunderten angebaut, ohne dass die Pflanze jemals als Unkraut aufgefallen wäre. In der Gattung *Gossypium* sind keine Arten bekannt, welche in agronomischer oder ökologischer Hinsicht problematische Unkrauteigenschaften besitzen. Den modernen Baumwollkultivaren einschließlich der Biotechsorten fehlen alle Attribute, die gewöhnlich bei Unkräutern zu finden sind, wie lange Dormanz und Überdauerungsfähigkeit der Samen im Boden, Keimfähigkeit unter ungünstigen Bedingungen, schnelles vegetatives Wachstum, kurzer Entwicklungszyklus, Bildung sehr zahlreicher Samen und hohes Verbreitungspotential der Samen auch über weite Entfernungen. Zudem ist Baumwolle kälteempfindlich und übersteht harte Frostperioden nicht.

Baumwolle vermehrt sich normalerweise nicht vegetativ, sondern verbreitet sich auf natürlichem Wege nur durch Samen. Das größte Verbreitungspotential besitzt der unverarbeitete Samen, der noch alle Samenhaare besitzt. Der nach maschineller Entfernung der langen Samenhaare erhaltene fusselige Samen kann, wenn er weiter verwendet wird, entlang der Transportwege oder bei Verfütterung durch Verschütten ebenfalls verbreitet werden. Das niedrigste Verbreitungspotential haben die vollständig enthaarten Samen. Volontäre, die aus solchen Samen gekeimt sind, findet man überwiegend in der Nähe von Baumwollkulturen, wo sie nach unbeabsichtigtem Ausstreuen von Saatgut heranwachsen können. *Gossypium hirsutum* und *Gossypium barbadense* können so verwildern und kleine Wildpopulationen außerhalb der Baumwollkulturflächen bilden. Man sieht in diesen aber keine Gefahr ([OGTRc, 2002](#)).

8.2.5 Übertragung aus Biotechpflanzen stammender Transgene auf andere Organismen

Viele Studien zur Ausbreitung aus Biotechpflanzen stammender Transgene in der Biosphäre waren und sind bis heute stark von der Vorstellung geprägt, dass jedes in Kulturpflanzen exprimierte Transgen eine schwer kalkulierbare Gefahr für Mensch und Umwelt darstellt und die Freisetzung deshalb, wenn irgend möglich, unterbunden werden muss. Die seit langem bekannten molekulargenetischen und biochemischen Eigenschaften der Transgene, welche in den bisher zum kommerziellen Anbau zugelassenen Biotechpflanzen verwandt werden, stützen diese Vermutung nicht. Empirisch widerlegt wird sie durch die seit mehr als 10 Jahren mit dem weltweiten Anbau von Biotechpflanzen in den Anbauländern gesammelten Erfahrungen. Die statistische und populationsdynamische Analyse inner- und zwischenartlicher Genflüsse zwischen transgenen und konventionellen Kulturpflanzen und ihren wilden Verwandten ist dennoch nicht nur von wissenschaftlichem Interesse. Erstens kann bei neuen Transgenen nie mit letzter Sicherheit vorausgesagt werden, wie sie sich in der freien

Natur verhalten werden, solange es keine zuverlässigen Freilandstudien gibt. Zweitens gibt es sowohl klassische als auch transgene genetische Merkmale, bei denen von vornherein feststeht, dass eine Verbreitung selbst in der näheren Umgebung eines Feldes unerwünscht ist. So wird es ein Rapsbauer, der Doppelnultraps für die Speiseölgewinnung anbaut, nicht gern sehen, wenn sein Nachbar in unmittelbarer Nähe seiner Felder für die Biodieselproduktion bestimmte HEAR (High Erucic Acid Rape) -Varietäten von Raps oder Stoppelrübe kultiviert. Er muss ja damit rechnen, dass seine Ernte ungenießbar wird, weil seine Pflanzen hybride Samen ansetzen, die mehr oder weniger deutlich den HEAR-Phänotyp zeigen. Auch um der Produktion von Hybridsaatgut dienende reine Linien erhalten zu können, ist es notwendig, eine unkontrollierte Bestäubung durch Insekten oder Pollenflug zu verhindern, sei es durch die Einhaltung von Mindestabständen zwischen den Kulturen oder durch andere Schutzmaßnahmen. Ihre Wirksamkeit kann man nur beurteilen, wenn man die Ausbreitungsmechanismen des Pollens und die daraus resultierenden Auskreuzungsfrequenzen kennt. Grundsätzlich lassen sich zwei Szenarien unterscheiden: Die innerartliche (intraspezifische) Genübertragung zwischen artgleichen und die zwischenartliche (interspezifische) zwischen artverschiedenen Individuen.

8.2.5.1 Mais

Das Auskreuzungspotential von Biotechmais entspricht dem der konventionellen Sorten. Unter den Wildpflanzen kommen als Kreuzungspartner für den Mais nur die in Amerika beheimateten Vertreter der Gattungen *Teosinte* und *Tripsacum* in Betracht. Zwar kann der Mais mit allen Teosinten fruchtbare Bastarde bilden, ihre Vitalität ist aber reduziert und ihr Vermehrungspotential stark eingeschränkt. Kreuzungen zwischen Mais und *Tripsacum* gelingen selbst im Labor nur schwer. Die Nachkommen sind oft steril und kaum lebensfähig. Selbst die mildesten Winter überleben sie nicht.

8.2.5.2 Raps und Rapsverwandte

Raps

Rapspollen wird sowohl durch den Wind als auch durch Insekten verbreitet. Abb. 80 zeigt das Ausbreitungsmuster von Graspollen durch den Wind. Typisch ist der schnelle Abfall mit der Entfernung und der lange Schwanz im niedrigen Bereich. Die Kurve repräsentiert die maximal verfügbare Pollenmenge. In der Praxis wird wahrscheinlich nur ein kleiner Teil davon eine sexuell kompatible Pflanze erreichen können, die gerade blüht und noch nicht von einer Nachbarpflanze bestäubt wurde.

Beim Raps wandert die Hauptmasse des Pollens weniger als 10 m, und die Pollenmenge nimmt mit der Entfernung von der Quelle rasch ab. In extremen Fällen kann Rapspollen durch den Wind mehrere 100 m bis km weit verfrachtet werden. Es gibt keine systematischen Untersuchungen zur Windverfrachtung von Rapspollen über große Entfernungen. Untersuchungen an anderen Pflanzen haben jedoch gezeigt, dass Pollenflug auch über mehrere 100 km möglich ist ([Tyldesley 1973](#)).

Die Futtersuche Nektar sammelnder Insekten ist komplex. Wenn Blüten reichlich vorhanden sind wie in einem blühenden Rapsfeld, tendieren Honigbienen dazu, Nektar und Pollen von unmittelbar benachbarten Blüten zu sammeln. Werden Bienenstöcke in unmittelbarer Nähe von Rapsfeldern aufgestellt, wird die Futtersuche größtenteils auf die unmittelbare Umgebung des Stocks und benachbarte Pflanzen beschränkt. Der Bienenflug findet dann fast nur in einem Umkreis von einigen Dutzend m² statt, und der Pollen wird größtenteils nicht weiter als 5 m transportiert. Gelegentlich besuchen Bienen Blüten noch in einer Entfernung von 2-4 km vom Stock.

Rapsblüten produzieren erhebliche Pollenmengen. Da die Hauptmasse des Pollens unabhängig vom Verbreitungsmechanismus nur kurze Entfernungen bewältigen kann, nimmt die Auskreuzungsfrequenz mit der Entfernung von der Pollenquelle rasch ab. Im Abstand von 0-3 km gemessene Auskreuzungsraten liegen zwischen 0,15% und 0,01%. Bereits bei einem Abstand von 100 m liegen sie unter 0,14%. Die Entfernungen variieren je nach den lokalen Bedingungen (z. B. der Windrichtung und -geschwindigkeit), der Anlage der Experimente (Größe und Orientierung der Felder) und der Insektenaktivität (Abb. 81). Da bei der Versuchsanordnung, die diesen Zahlenwerten zugrundeliegt, als Pollenempfänger männlich sterile Rapspflanzen verwendet wurden, die sich nicht selbst befruchten können, simuliert der Versuch den theoretisch ungünstigsten Fall.

Der Genaustausch zwischen benachbarten Rapsfeldern ist ebenfalls schwach und nimmt mit der Distanz rasch ab (Abb. 82). Unter australischen Bedingungen findet man bereits bei einem Feldabstand von 1,5 m, dass nur 1% der Pflanzen eines Feldes aus dem Nachbarfeld stammende Gene tragen. Bei einem Feldabstand von 1,5 km liegt

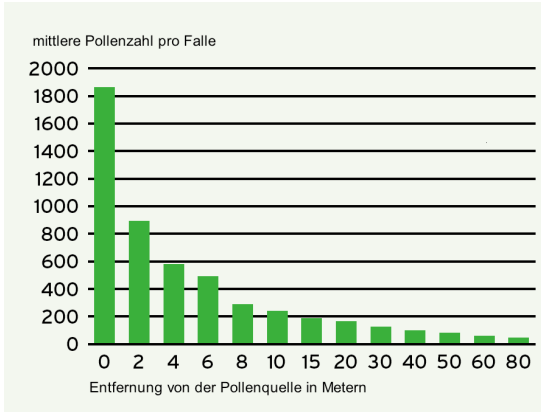


Abb. 80. Verbreitung von Graspollen durch den Wind (ABE, 2002, nachbearbeitet).

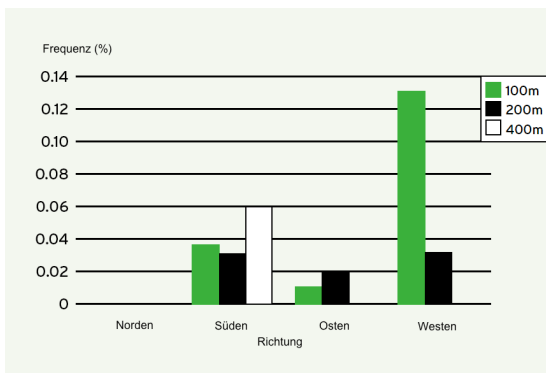


Abb. 81. Bruchteil herbizidtoleranter Rapsamen, die von Körbepflanzen in verschiedenen Entfernungen von einem Biotechrapfeld geerntet wurden. (ABE, 2002, nachbearbeitet).

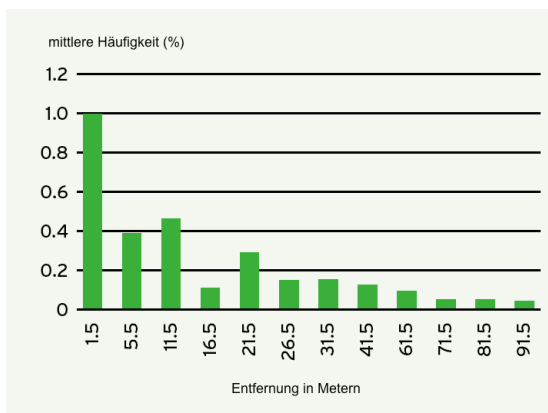


Abb. 82. Ausbreitung von Herbizidresistenzgenen zwischen Rapsfeldern durch Pollenflug (ABE, 2002, nachbearbeitet).

der Prozentsatz unter 0,2% und bei 2,6 km bei 0,15%. In einer Entfernung zwischen 3 und 6 km kann keine Auskreuzung mehr festgestellt werden. Die unkontrollierte Auskreuzung oder Auswilderung von Raps ist bisher nirgends zu einem Problem geworden, weder bei der Produktion hochreinen Saatguts noch in der Rapsproduktion oder in der Umwelt (OGTRa, 2002).

Raps hat im Gegensatz zum Mais sowohl wilde als auch domestizierte Verwandte, mit denen er lebensfähige Bastarde bilden kann. Er kann mit mindestens 15 anderen *Brassica*-Arten hybridisieren, von denen einige bekannte Unkräuter sind. Dies mag erklären, dass es zum Hybridisierungsverhalten dieser Kulturpflanze besonders viele Studien gibt. Herbizidresistenzgene, Gene, die fluoreszierende Proteine kodieren, aber auch bestimmte DNA-Merkmale wie die in der Genomkartierung wichtigen AFLP-Marker (Amplifizierte Fragmentlängenpolymorphismen) erlauben die sichere Identifizierung einzelner Bastarde auch in großen Populationen. So können die Hybridisierungswahrscheinlichkeiten näherungsweise ermittelt werden, mit denen *Brassica napus* Gene auf seine sexuell kompatiblen Verwandten überträgt (Warwick u. a., 2003). Zu diesen gehören *Brassica rapa* (Stoppelrübe, Rübsen), *Raphanus raphanistrum* (Wilder Rettich), *Sinapis arvensis* (Ackersenf) und *Erucastrum gallicum* (Französische Hundsrauke). In Kanada, dem wichtigsten Biotechrapproduzenten, kommen alle vier Arten in den Rapsanbaugebieten vor.

Brassica rapa (Rübsen, Stoppelrübe)

Der Rübsen ist mit *Brassica napus* eng verwandt. Er hat einen ähnlichen Lebenszyklus, aber eine kürzere Vegetationsperiode. In Europa wird Rübsen noch angebaut, sowohl als Sommer- als auch als Wintervarietät. In anderen Ländern, z. B. Australien, wurde *Brassica rapa* bereits Mitte der 80er Jahre durch höherwertige Canolarassen ersetzt. *Brassica napus* (AACC) und *Brassica rapa* (AA) haben einen gemeinsamen Chromosomensatz, was interspezifische Auskreuzungen sehr begünstigt. Kreuzungen der beiden Arten liefern lebensfähige Bastarde. In Gewächshaus- und ebenso in Feldversuchen findet man zwischen *Brassica napus* und *Brassica rapa* Genaustauschhäufigkeiten zwischen 7,7% und 8,3%. Die Pollenvitalität der Bastarde ist deutlich (auf 55%) reduziert. Die im Biotechrap vorkommenden Transgene bilden in der Wildflora keinen Selektionsvorteil. Aus diesen Gründen ist es unwahrscheinlich, dass *Brassica napus* x *Brassica rapa* -Hybriden in der Wildflora lange überdauern können.

Raphanus raphanistrum (Wilder Rettich)

Der wilde Rettich gehört zu den wichtigeren zweikeimblättrigen Unkräutern. Er kann mit Raps hybridisieren mit einer Frequenz von $3 \cdot 10^{-5}$ bis $3 \cdot 10^{-7}$ (ein Bastard unter 300'000 bis 30 Millionen Rettichkeimlingen). Eine nachhaltige über mehrere Generationen erfolgreiche Einkreuzung von Raps genen in den Rettich ist bisher nicht beobachtet worden.

Sinapis arvensis (Ackersenf)

Der Ackersenf ist ein verbreitetes Unkraut, gilt aber als sexuell

unverträglich mit dem Raps. Hybride, bei denen Raps der Pollenspender war, sind bisher nicht bekannt.

Erucastrum gallicum (Französische Hundsrauke)

Hybride zwischen *Brassica napus* und *Erucastrum gallicum* sind im Feld bisher nicht gefunden worden. Falls ein Genaustausch zwischen diesen Arten vorkommt, ist die Austauschhäufigkeit $< 2 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$.

Hirschfeldia incana (Bastardsenf)

Der in Deutschland heimische Bastardsenf vermag mit dem Raps spontan mit geringer Frequenz lebensfähige Bastarde zu bilden. Ihr Vermehrungspotential ist gering. Die Introgression von Rapsgenen in Bastardsenfpopulationen ist deshalb extrem unwahrscheinlich und bisher nicht beobachtet worden.

Kohlgemüse (*Brassica oleracea*)

Ein Genfluss von Canola zu Kohlgemüsen (Weißkohl, Rotkohl, Broccoli, Kohlrabi u. a.) ist denkbar, aber im Feld bisher nicht beobachtet worden. Gemüsekohl wird gewöhnlich vor der Blüte geerntet, was die Bildung von Bastarden sehr erschwert.

8.2.5.3 Soja

Die Gattung *Glycine* besteht aus zwei Untergattungen, *Glycine* und *Soja*. Zur Gattung *Soja* gehören neben *Glycine max* noch *Glycine soja* ($2n = 40$) und *Glycine gracilis* ($2n = 40$), zwei wilde bzw. halbwilde Sojaverwandte Asiens. *Glycine soja* ist ein wild wachsendes einjähriges Kraut mit kleinen schmalen dreigliedrigen Blättern, purpurfarbenen Blüten und kleinen runden schwarzbraunen Samen. Die Art wächst wild in Korea, Taiwan, China und den asiatischen Grenzgebieten der früheren Sowjetunion. *Glycine gracilis*, eine Zwischenform von *Glycine soja* und *Glycine max*, ist in Nordost-China gefunden worden. Beide Arten sind leicht mit *Glycine max* kreuzbar und bilden fruchtbare Hybride. Die Untergattung *Glycine* enthält neben einjährigen (annuellen) eine Reihe mehrjähriger (perennierender) Arten, die man in Australien, den südpazifischen Inseln, den Philippinen, Taiwan und China findet. Mit speziellen Kulturverfahren sind in einigen Fällen im Labor Hybride der Sojabohne mit perennierenden *Glycine*-Arten erhalten worden. Sie waren ohne Ausnahme steril. In den USA, dem größten Sojaproduzenten, kommen keine wilden Sojaverwandten vor. Sie werden zwar gelegentlich auf Versuchsflächen angebaut. Bisher ist ein unkontrollierter Übergang von Transgenen auf wilde Verwandte der Sojabohne nicht beobachtet worden.

8.2.5.4 Baumwolle

Die Kreuzbefruchtung einer verwilderten Baumwollkultursorte durch artgleichen Pollen aus einem Baumwollfeld ist die wahrscheinlichste Art der Übertragung von Baumwollgenen in die Umwelt. Darüber hinaus können fertile Nachkommen auch durch Kreuzung verschiedener Baumwollarten entstehen, z. B., wenn *Gossypium hirsutum* durch *G. barbadense* kreuzbefruchtet wird. Geographische Barrieren zwischen den Populationen machen solche Hybridisierungen jedoch in der Regel unwahrscheinlich. Vermehrt gilt das auch für die Hybridisierung von Kulturbaumwolle mit wilden Baumwollvertretern. *G. hirsutum* und *G. barbadense*, die weltweit den größten Teil der kultivierten Baumwolle ausmachen, sind tetraploid. Die wilden Baumwollarten sind diploid. Wegen der genetischen Inkompatibilität der diploiden und tetraploiden Arten ist hier die Wahrscheinlichkeit der Bildung fertiler Hybriden praktisch Null. Es hat zahlreiche Versuche gegeben, *G. hirsutum* unter Labor- und Gewächshausbedingungen mit wilden Vertretern der Gattung *Gossypium* zu hybridisieren. Teils sind dabei auch keimfähige Samen erhalten worden. Die Keimlinge erwiesen sich durchweg als hinfällig und im Freiland nicht überlebensfähig (Lackey, 2009).

Da die Pollenkörner der Baumwolle ziemlich groß und schwer sind, werden sie durch den Wind nur schlecht übertragen. Die Hauptrolle bei der Pollenverbreitung spielen Bienen, Hummeln und andere blütenbesuchende Insekten. Feldversuche zeigen, dass Insekten Baumwollpollen nur über kurze Strecken transportieren. Auskreuzungen sind, wenn sie vorkommen, auf die unmittelbare Umgebung der Pollenquelle beschränkt, und die Auskreuzungsfrequenz nimmt mit der Entfernung von der Pollenquelle rasch ab. In Australien gilt deshalb ein Pflanzabstand von 4 m als ausreichend für die Produktion zertifizierten Baumwollsaatguts. Ab einer Entfernung von 9 m von einem zentralen transgenen Testareal liegt die mit einem Kanamycinresistenz-Gen gemessene mittlere Auskreuzungshäufigkeit zwischen transgener und nicht transgener Baumwolle unter 0,12% (Umbeck u. a., 1991). Bei einer 1996 (Llewellyn & Fitt, 1996) in Neu-Süd-Wales durchgeführten Studie wurden 200 transgene Baumwollpflanzen in einen 8 ha großen Plot nicht transgener Baumwolle eingebettet. Man sammelte dann die Samen, die die nicht transgenen Pflanzen angesetzt hatten und untersuchte sie auf die

Gegenwart des transgenen Markerproteins der transgenen Sorte. Sechs von 37'000 Samen waren durch Auskreuzung mit transgenem Pollen entstanden, und alle fanden sich in einer 3 m breiten Zone um den transgenen Plot.

Weitere zahlreiche Studien mit transgenen und klassischen Merkmalen bestätigen die geringen Auskreuzungsfrequenzen. Im Abstand von 10 m von der Pollenquelle liegen sie gewöhnlich unter 0,01%. Zwischen 16 und 20 m ist keine Auskreuzung mehr nachweisbar. Allerdings messen die erwähnten Studien die Ausbreitung von Baumwollpollen innerhalb von Baumwollfeldern. Wenn Baumwollpollen über brachliegende Felder verfrachtet wird, kann er größere Entfernungen bewältigen und die Auskreuzungsfrequenzen können höher sein. So ergab eine ägyptische unter diesen Bedingungen durchgeführte Studie mit *G. barbadense* bei einem Abstand von 35 m noch eine Auskreuzungsfrequenz von 0,16% ([Galal u. a., 1972](#)). Auch in diesem Fall nimmt die Auskreuzungsfrequenz mit der Entfernung von der Pollenquelle rasch ab.

8.2.5.5 Zuckerrübe

Die Zuckerrübe vermag wie bereits erwähnt mit allen Vertretern der Untergattung *Beta* fruchtbare Hybride zu bilden. In Nordamerika ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Herbizidtoleranz durch Pollenflug aus Biotechrübenfeldern auf die Wildflora übertragen wird, gering, da die Untergattung *Beta* dort, abgesehen von einigen in Kalifornien existierenden Populationen der Unterart *Beta vulgaris* ssp. *macrocarpa*, keine wilden Vertreter hat. In den Küstenregionen Europas, wo wilde *Beta-vulgaris*-Populationen existieren, muss nach Zulassung des Biotechnaubs mit einer Einwanderung des Merkmals in wilde Rübenpopulationen gerechnet werden. Dies gilt insbesondere dort, wo der Saatgutproduktion dienende Rübenkulturen in der Nähe von wilden Rübenpopulationen angelegt werden, da dann eine Genübertragung durch Pollenflug leicht möglich ist. Es ist allerdings kaum zu erwarten, dass der Anbau glyphosat- oder glufosinater Zuckerrüben zu einer dauerhaften Anreicherung der Herbizidtoleranz im Genbestand der wilden *Beta*-Formen führt. Zum einen hat sie wie gesagt nur in Gegenwart der Herbizide einen Selektionsvorteil; zum anderen ist die Konkurrenzfähigkeit aus Kreuzungen kultivierter und wilder Rüben hervorgegangener Hybriden an Wildstandorten voraussichtlich gering.

8.2.5.6 Andere Pflanzen

Theoretisch könnte ein Gentransfer auch zwischen zwei sexuell nicht kompatiblen Arten erfolgen, wenn eine dritte Art, die mit den beiden anderen kompatibel ist, als Zwischenträger dient. Dafür, dass so etwas zwischen Biotechpflanzen und ihren wilden Verwandten vorkommt, gibt es bisher keine konkreten Anhaltspunkte. Ebenso wenig gibt es Berichte über einen stabilen Gentransfer von Biotechpflanzen auf Tiere, den Menschen oder Mikroorganismen. Hierzu wären stets mehrere molekulare Schritte notwendig, von denen jeder einzelne unwahrscheinlich ist: Die Pflanzen-DNA müsste den enzymatischen Abbau durch von Bodenbakterien oder im Verdauungstrakt gebildete Nukleasen überleben, die Membran der Empfängerzellen durchqueren, stabil ins Zellgenom oder in ein bakterielles Plasmid eingebaut und in richtiger Orientierung und im richtigen Leseraster hinter einen aktiven pro- oder eukaryontischen Promoter gestellt werden. Der spontane Einbau pflanzlicher oder tierischer DNA ins menschliche Genom ist nie beobachtet worden, obwohl der Mensch täglich große Mengen davon verzehrt.

Umfassende Literaturrecherchen ([Sanvido u. a., 2006](#); [Klümper & Qaim, 2014](#)) zeigen, dass das hier diskutierte Ausbreitungsverhalten heute verbreiteter eingesetzt Transgene nicht den Einzelfall beschreibt, sondern typisch ist. Ernsthafte ökologische Schäden wie die Verdrängung von Wildpflanzen durch in die Wildflora eingedrungene Biotechpflanzen oder aus diesen stammende Transgene oder gar die Entstehung transgener nicht mehr kontrollierbarer "Superunkräuter" sind bisher nirgends beobachtet worden. Auch in Deutschland, wo die Risikoforschung dank massiver staatlicher Förderung seit Jahren besonders intensiv betrieben wird, ist die Suche nach mit dem Anbau von Biotechpflanzen verbundenen konkreten Umwelt- und Gesundheitsrisiken bis heute ohne greifbares Resultat geblieben.

8.2.5.7 Lässt sich der Genaustausch von Biotechpflanzen mit anderen Pflanzen verhindern?

Die in den bisher angebauten Biotechpflanzen aktiven Transgene richten nach heutigem Wissen in der Umwelt keinen Schaden an, selbst dann nicht, wenn sie unkontrolliert auf andere Pflanzen übertragen werden. Man kann sich aber durchaus Transgene vorstellen, deren unbeabsichtigte Freisetzung problematisch ist. Dies trifft z. B. auf Gene zu, welche die Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten, Hitze, Wassermangel oder anderen Stressfaktoren steigern und damit möglicherweise die Konkurrenzfähigkeit gegenüber der Wildflora erhöhen, ebenso

auf Transgene, welche neue Stoffwechselleistungen ermöglichen wie die Biosynthese von Medikamenten, Impfstoffen oder anderen biologisch aktiven Verbindungen. Bereits heute gibt es mehrere Systeme unterschiedlicher Anwendungsreife, mit denen sich ein ungewollter Genfluss von Biotechpflanzen auf andere Pflanzen verhindern lässt: Männlich sterile Linien lassen sich auch in der Produktion verwenden. Dies ist zwar aufwendiger als der Einsatz von Hybridsaatgut und mit Ertragseinbußen verbunden. Bei einer Sorte, die nicht für die Nahrungsmittelproduktion bestimmt ist, sondern einen wertvollen Wirkstoff produziert, der nur in relativ geringen Mengen benötigt wird, würde das aber keine große Rolle spielen. Die Transformation des Chloroplastengenoms kann die Transgenfreisetzung durch den Pollen verhindern, da die Chloroplasten bei den meisten Nutzpflanzen nur mütterlich über die Eizellen weitergegeben werden. Die Verbreitung transgener Samen kann verhindert werden, indem man die Keimfähigkeit von einem Außensignal wie einem chemischen Induktor abhängig macht. Schließlich gibt es molekulargenetische Rekombinationssysteme, die sich im Prinzip dazu verwenden lassen, ein Transgen während der Pollenentwicklung aus dem Genom zu eliminieren oder die Samenentwicklung so umzusteuern, dass zwar Reservestoffe gebildet werden, aber kein lebensfähiger Embryo entsteht ([Daniell, 2002](#)).

8.3 Schlussbemerkungen

Der Anbau von Biotechpflanzen hat messbare Vorteile, die sich in höheren Erträgen, geringeren Umweltbelastungen und niedrigeren Produktionskosten niederschlagen. Biotechpflanzen unterscheiden sich bis auf unter Sicherheitsaspekten bedeutungslose geringe Abweichungen nicht von ihren nicht transgenen Eltern. Sie produzieren keine neuen Toxine, Allergene oder andere qualitätsmindernde Inhaltsstoffe und haben auch kein höheres Unkrautpotential. Ernteprodukte von Biotechpflanzen haben mindestens die gleiche Qualität wie diejenigen konventioneller Sorten. Ein Genaustausch zwischen transgenen und konventionellen Kulturen bewirkt keine Qualitätsminderung der konventionell erzeugten Ernte. Deshalb ist die Erschwerung oder Verhinderung des Parallelanbaus von Biotechsorten und konventionellen Sorten durch Festlegung überdimensionierter Sicherheitszonen, einseitige Haftungsregelungen oder andere prohibitive Maßnahmen wissenschaftlich nicht vertretbar.

Artgleiche Biotechpflanzen hybridisieren sowohl untereinander als auch mit ihren konventionellen Gegenstücken. Die Austauschfrequenzen zwischen transgenen und konventionellen Feldern sind gering und nehmen mit der Entfernung rasch ab. Wo es notwendig ist, wie bei der Züchtung reiner Linien, ist dieser Genfluss durch Wahrung minimaler Pflanzabstände und andere Schutzmaßnahmen leicht unter Kontrolle zu halten. In geringem Umfang hybridisieren Biotechpflanzen auch mit verwandten Arten. Am häufigsten beobachtet man den Genaustausch beim Raps. Ernsthafte ökologische Schäden durch in die Wildflora eingedrungene Transgene wurden bisher nicht bekannt.

Die Kernhypothese der europäischen Zulassungspraxis ([König u. a., 2004](#)), die sich wie ein roter Faden durch die EFSA-Sicherheitsdokumente zieht, ist die Annahme, dass die experimentelle Transformation von der sexuellen Rekombination und anderen natürlichen Genomveränderungen grundverschieden ist und deshalb leicht zu unbeabsichtigten potentiell desaströsen genetischen Veränderungen im Zielorganismus führen kann. Bisher ist sie von keinem Zulassungsverfahren bestätigt worden und steht zudem im Widerspruch zu den mit der weltweiten kommerziellen Biotechpflanzenproduktion gewonnenen Erfahrungen. Das heißt nicht, dass Biosicherheitsprüfungen künftig überflüssig sind. Sie sind solange sinnvoll und notwendig, wie sie sich auf die Untersuchung empirisch nachgewiesener oder beim aktuellen Wissensstand begründbarer Risiken beschränken. Was darüber hinausgeht, verzögert und verteuert lediglich den Zulassungsprozess und verhindert, dass Produzenten und Verbrauchern die Vorteile der Agrotechnik zugutekommen.

9 Quellenverzeichnis

Bei Datenbanken und anderen evolvierenden Quellen ist die Jahreszahl im Quellennamen das Jahr des letzten Zugriffs.

1. ABE, 2002. Agricultural Biotechnology in Europe. The Environmental Impact of Agricultural Biotechnology
2. Abuodeh R. O. u. a., 2000. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. [Journal of Infectious Diseases 181: 2106–2110](#)
3. AEE, 2014. [Agentur für Erneuerbare Energien](#)
4. AFSSA01, 2007. Agence française de sécurité sanitaire des aliments [Dossier No 2007-SA-0109](#)
5. AFSSA02, 2010. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à son auto-saisine sur l'article publié dans 'International Journal of Biological Sciences' et intitulé 'A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health'. Afssa – [Saisine n° 2009-SA-0322](#)
6. Agarwal S. u. a., 2009. Floral Transformation of Wheat. [Methods in Molecular Biology 478:105-113](#)
7. AGEb, 2011. Energieverbrauch in Deutschland im Jahr 2010. [Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e. V.](#)
8. Al-Abed D. u. a., 2006. Split-seed: a new tool for maize researchers. [Planta 223: 1355-1360](#)
9. Alfano J. R. & Collmer A., 1997. The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death. [Journal of Bacteriology 179:5655–5662](#)
10. Allen A., 2011. Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut. [Plant Biotechnology Journal 9:1–8](#)
11. Allen R. S. u. a., 2004: RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. [Nature Biotechnology 22:1559-1566](#)
12. AMA, 2012. H-480.958 Bioengineered (Genetically Engineered) Crops and Foods. American Medical Association
13. AMI, 2013. [Agrarmarkt Informations-Gesellschaft mbH](#)
14. Anami S. u. a., 2013. Higher plant transformation: principles and molecular tools. [International Journal of Developmental Biology 57:483-494](#)
15. Anderson K. B. & Conder J. A., 2011. Discussion of Multicyclic Hubbert Modeling as a Method for Forecasting Future Petroleum Production. [Energy & Fuels 25:1578–1584](#)
16. Anireddy S. N. u. a., 2012. Deciphering the plant splicing code: experimental and computational approaches for predicting alternative splicing and splicing regulatory elements. [Frontiers in Plant Science 3 |Article 18 | 1](#)
17. Anireddy S. N. u. a., 2013. Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants. [The Plant Cell 25:3657–3683](#)
18. Anoop V. M. u. a., 2003. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. [Plant Physiology 132: 2205-2217](#)
19. Anraku Y. u. a., 2005. Protein Splicing: Its Discovery and Structural Insight into Novel Chemical Mechanisms. [IUBMB Life 57:563 – 574](#)
20. Arjō G. u. a., 2012. Mice fed on a diet enriched with genetically engineered multivitamin corn show no sub-acute toxic effects and no sub-chronic toxicity. [Plant Biotechnology Journal 10:1026-1034](#)
21. ASA, 2007. American Soybean Association, [Archive for September 2007](#)
22. Baerson S. R. u. a., 2002. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 4-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. [Plant Physiology 129: 1265 - 1275](#)
23. Bartholmes C., 2008. Germline transformation of Shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris*) by the 'floral dip' method as a tool for evolutionary and developmental biology. [Gene 409:11-19](#)
24. BASF, 2008. BASF-Presseinformation
25. BASF, 2012. BASF-Presseinformation
26. Bayerische Staatszeitung, 2011. [Das Gen-Honig-Urteil – und wie es weiter geht](#)
27. Behrens M. R. u. a., 2007. Dicamba Resistance: Enlarging and Preserving Biotechnology-Based Weed Management Strategies. [Science 316:1185-1187](#)
28. Bennett R. u. a., 2004. Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide-tolerant sugar beet: a life-cycle assessment. [Plant Biotechnology Journal 2:273–278](#)
29. Bent A., 2006. Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. [Methods in Molecular Biology 343:87-103](#)
30. Betz F. S. u. a., 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. [Regulatory Toxicology and Pharmacology 32: 156-173](#)
31. BfR, 2007. [Stellungnahme Nr. 009/2007](#) des Bundesinstituts für Risikobewertung BfR, 29. 3. 2007
32. Bhalla P. L. u. a., 1999. Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen. [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 96:11676-11680](#)
33. Bicar E. H. u. a., 2008. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. [Transgenic Research 17:59-71](#)

34. Bilyeu K. D. u. a., 2008. Quantitative Conversion of Phytate to Inorganic Phosphorus in Soybean Seeds Expressing a Bacterial Phytase. [Plant Physiology 146:468–477](#)
35. Blaser J. P. & Pritzker A., 2014. Energiepolitik, wo ist die Stimme der Physiker? [SPG-Mitteilungen 44:40-42](#)
36. Bortesi L., Fischer R., 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. [Biotechnology Advances 33:41-52](#)
37. Brand S., 2011 in: James, C., [ISAAA Brief 43-2011](#): Executive Summary. Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2011
38. Brooks G. u. a., 2010, in: Park, J. u. a., 2011. The impact of the EU regulatory constraint of transgenic crops on farm income. [New Biotechnology 28:397-406](#)
39. Buntzel-Cano, 2005. Bittere Zuckerpolitik. Zeitschrift für Entwicklung und Zusammenarbeit 1:30-32.1
40. Burkhardt P. K. et al. (1997): Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. [The Plant Journal 11: 1071-1078](#)
41. Burns J. M., 2002. 13-Week Dietary Subchronic Comparison Study with MON 863 Corn in Rats Preceded by a 1-Week Baseline Food Consumption Determination with PMI Certified Rodent Diet #5002. Monsanto Company. [CERA](#)
42. Bustos u. a., 1991. Positive and negative cis-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter. [EMBO Journal 10:1469-1479](#)
43. BVerfG, 2010. Bundesverfassungsgericht, Entscheidungen. [1 BvF 2/05 vom 24.11.2010](#), Absatz-Nr. (1 - 318)
44. BVL, 2012. Inlandsabsatz und Export von Pflanzenschutzmitteln - Jahresbericht 2012. [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit](#)
45. Cabanilla L. S. u. a., 2005. Economic cost of non-adoption of Bt-cotton in West Africa: with special reference to Mali. [International Journal of Biotechnology 7:46 - 61](#)
46. Canadian Food Inspection Agency, 1996. [Decision Document DD96-08](#): Determination of Environmental Safety of Calgene Inc.'s High Laurate Canola
47. Canova A., 1959. On the pathology of sugar beet. Informatore fitopatologico 9:390– 396
48. Cao J. u. a., 2006. *Bacillus thuringiensis* protein production, signal transduction, and insect control in chemically inducible PR-1a/cry1Ab broccoli plants. [Plant Cell Reports 25:554-560](#)
49. Cao M. u. a., 2011. Genetic Engineering of Maize (*Zea mays*) for High-Level Tolerance to Treatment with the Herbicide Dicamba. [Journal of agricultural and food chemistry 59:5830-5834](#)
50. Cardoza V. & Stewart C. N., 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. [Plant Cell Reports 21: 599-604](#)
51. Castiglioni P. u. a., 2008. Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions[W]. [Plant Physiology 147:446-455](#)
52. CERA, 2015. [GM Crop Database](#). Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C.
53. CERAA. USDA/APHIS Environmental Assessment - In response to MonsantoPetition 06-178-01p seeking a Determination of Non-regulated Status for Roundup R Ready2 Yield Soybean MON 89788. [CERA](#)
54. CERAb. Glufosinate facts. [CERA](#)
55. CGB, 2007. Commission du génie biomoléculaire, 12. 6. 2007. [Avis](#)
56. Chapman, I., 2014. The end of Peak Oil? Why this topic is still relevant despite recent denials. [Energy Policy 64:93-101](#)
57. Chee, P. P. u. a., 1986. Expression of a bean storage protein 'phaseolin minigene' in foreign plant tissues. *Gene* 41:47-57
58. Chen R. u. a., 2008. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. [Transgenic Research. 17:633-643](#)
59. Chen Q. & Lai, H., 2013. Plant-derived virus-like particles as vaccines. [Human vaccines & immunotherapeutics 9:26–49](#)
60. CIC, 2015. [Cotton Insect Corner](#)
61. CIMMYT, International Maize and Wheat Improvement Center. [CIMMYT](#)
62. Cox R. S. u. a., 2013. PromoterCAD: data-driven design of plant regulatory DNA. [Nucleic Acids Research \(Web Server Issue\) 41:W569-W574](#)
63. Crabill u. a., 2012. The *Pseudomonas syringae* HrpJ protein controls the secretion of type III translocator proteins and has a virulence role inside plant cells. [Molecular Microbiology 85:225-238](#)
64. Crawley M. J. u. a., 2001. Transgenic crops in natural habitats. [Nature 409:682-683](#)
65. Daily Mail, 14. 3. 2007. GM corn 'could cause liver and kidney damage'. [Daily Mail 14. 3. 2007](#)
66. Dale E. C. & Ow D. W., 1990. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. [Gene 91:79-85](#)
67. Dale E. C. & Ow D. W. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88:10558–10562](#)
68. Daniell H. u. a., 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. [Trends in Plant Science 6: 219 - 226](#)

243 Quellenverzeichnis

69. Daniell H., 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. [Nature Biotechnology 20:581-586](#).
70. Daniell H. u. a., 2005. Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. [Trends in Biotechnology 23:238-45](#)
71. Davies K. M., 2007. Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. [Mutation Research 622:122-137](#)
72. Day A. & Goldschmidt-Clermont M., 2011. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. [Plant Biotechnology Journal 9:540-553](#)
73. Dean M., 2002. [The Human ATP-Binding Cassette \(ABC\) Transporter Superfamily](#). NCBI, PubMed
74. De Block M. u. a., 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *The EMBO Journal* 3:1681-1689
75. Deitloff u. a., 2015. Effects of refuges on the evolution of resistance to transgenic corn by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Pest Management Science*. [72:190-198](#)
76. de la Fuente u. a., 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. [Science 276: 1566-1568](#)
77. Denis C. u. a., 1993. Expression of Engineered Nuclear Male Sterility in Brassica napus (Genetics, Morphology, Cytology and Sensitivity to Temperature). [Plant Physiology 101:1295-1304](#)
78. DiLeo, M., 2012. Monsanto's GM Drought Tolerant Corn. [Biology Fortified](#), 25 August 2012
79. Doebley J. 2015. University of Wisconsin-Madison. [Teosinte](#)
80. Dohm J. C. u. a., 2014. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). [Nature 505, 546-549](#)
81. Downes S. u. a., 2007. Monitoring and adaptive resistance management in Australia for Bt-cotton: Current status and future challenges. [Journal of Invertebrate Pathology 95:208-213](#).
82. Downie J. A., 2005. Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules. [Current Biology 15:R196-198](#)
83. Drakakaki G. u. a., 2005. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. [Plant Molecular Biology 59: 869-880](#)
84. Dufourmantel N. u. a., 2007. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance. [Plant Biotechnology Journal 5:118-133](#)
85. Duncan C. N. und Weller S. C., 1987. Heritability of glyphosate susceptibility among biotypes of field bindweed. *Journal of Heredity* 78: 257-260
86. Duncan J., 2003. [Costs of Biodiesel Production](#)
87. Easterbrook G., 1997. Forgotten Benefactor of Humanity. [The Atlantic Monthly 279:75-82](#)
88. EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. [EFSA Journal 48:1-18](#)
89. EFSA, 2007a. [Amtsblatt der EU, 16. 9. 2008, L247/50](#)
90. EFSA, 2007b. EFSA reaffirms its risk assessment of genetically modified maize MON 863. [EFSA-Pressemitteilung, 28. 6. 2007](#)
91. EFSA, 2010. Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). [EFSA Journal 8:1879](#)
92. EFSA, 2011. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). [EFSA Journal 9:2150](#)
93. EG, 2003. [Verordnung \(EG\) Nr. 1829/2003](#) des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel. Amtsblatt L 268 vom 18.10.2003, S. 1
94. Eizaguirre M. u. a. 2006. Six years after the commercial introduction of Bt maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. [Transgenic Research 15: 1-12](#)
95. ENA, 2015. European Nucleotide Archive. [Akzession J01263.1](#)
96. EPA, 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 Protein and the Genetic Material Necessary for its Production (Vector ZMIR13L) in Event MON863 Corn (006484). [Publication U. S. Environmental Protection Agency Fact Sheet](#)
97. EPPO, 2015. [EPPO Global Database](#)
98. ESA, 2013: United Nations, Department of Economic and Social Affairs. Population Division, [Population Estimates and Projections](#) Section
99. EUGH, 2011. Urteil des Europäischen Gerichtshofs (Große Kammer) vom 6. September 2011 in der [Rechtssache C-442/09](#)
100. EU-Kommission, 2010. [EU-Kommission will nationale Entscheidungen über Gen-Anbau](#)
101. EU-Parlament, 2015. Parlament ermöglicht GVO-freie Zonen in den EU-Staaten. [Pressemitteilung](#)
102. Europabio. [www.europabio.org](#)
103. Europäischer Rechnungshof, 2000. Sonderbericht Nr. 20/2000 über die Verwaltung der gemeinsamen Marktorganisation für Zucker, zusammen mit den Antworten der Kommission. [Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften / C ; 44.2001,50](#)

104. FAOSTAT, 2016. [Index](#)
105. Farinas C. S. u. a., 2005. Aqueous extraction of recombinant human proinsulin from transgenic maize endosperm. [Biotechnology Progress 21: 1466 - 1471](#)
106. Ferroni F. & Hopkirk R. J., 2016. Energy Return on Energy Invested (ERoEI) for photovoltaic solar systems in regions of moderate insolation. [Energy Policy 94:336–344](#)
107. FNR, 2014. [biokraftstoffe](#)
108. Fox J. L., 2003. Resistance to Bt toxin surprisingly absent from pests. [Nature Biotechnology 21: 958-959](#)
109. Freude, D. & Snurr, R., 2011. Physik der Windturbine in: [Energie-Grundlagen](#)
110. Fuchs M., 2015. Schweinemast & Schweinefütterung. [AGRARNETZ.COM, Moderne Landwirtschaft](#)
111. Fuchs R. L. u. a., 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Biotechnology (N Y)* 11:1543-1547
112. Gaj Th. u. a., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. [Trends in Biotechnology 33:41-52](#)
113. Galal H. E. u. a., 1972. Effect of direction and distance on cross pollination in Egyptian cotton (*Gossypium barbadense* L.). [Experimental Agriculture 8: 67-71](#)
114. Gaskell G. u. a., 2005. [Europeans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends](#). Final Report on Eurobarometer 64.3. S. 55 ff. Special Eurobarometer. European Commission
115. Gatehouse A. M. 2002. The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. [Trends in Genetics 18: 249 - 251](#).
116. Geringer B., Tober W. K. [Auto-Umwelt](#)
117. Giddings G. u. a., 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. [Nature Biotechnology 18: 115-1155](#)
118. Gils M. & Marillonet S., 2008. A novel hybrid seed system for plants. [Plant Biotechnology Journal 6:226–235](#)
119. GMO Compass, 2015. [GM Soybean global cultivation area](#)
120. Goldstein D. A. u. a., 2005. Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation. [Journal of Applied Microbiology 99:7–23](#)
121. Gordon-Kamm W. J. u. a., 1990. Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. [The Plant Cell 2: 603-618](#)
122. Greenpeace, 2014. [Der Spiegel, November 2014](#)
123. Grundremmingen, 2014. [Kernkraftwerk Grundremmingen](#)
124. Grüner R. u. a., 2003. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. [European Journal of Biochemistry 270:4876-4886](#)
125. Guerrero-Andrade O. u. a., 2006. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. [Transgenic Research 15:455-463](#)
126. Hall u. a., 2009. What is the Minimum EROI that a Sustainable Society Must Have? [Energies 2:25-47](#)
127. Hartley J. L. u. a., 2000. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. [Genome Research 10:1788-1795](#)
128. Heap I. M., 1997. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. [Pesticide Science 51: 235 - 243](#).
129. Heckel D. G. u. a., 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. [Journal of Invertebrate Pathology 95:192-197](#).
130. Hensel, G. u. a., 2009. Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. [International Journal of Plant Genomics 2009:835608. Epub](#)
131. Herman E. M. u. a., 2003. Genetic Modification Removes an Immunodominant Allergen from Soybean. [Plant Physiology 132:36-43](#)
132. Herouet C. u. a. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. [Regulatory Toxicology and Pharmacology. 41: 134-149](#)
133. Herr A. J. & Baulcombe D. C., 2004: RNA Silencing Pathways in Plants. [Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LXIX](#). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 363 - 370
134. Hiatt A. u. a., 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. [342: 76-78](#)
135. Hiei Y. u. a. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. [Plant Molecular Biology 35: 205-218](#)
136. Hill J. u. a., 2006a. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 103:11206–11210](#)
137. Hill J. u. a., 2006b. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 103:11206–11210](#). Supporting Table 5, 7, 8
138. Hoa T. T. C. u. a., 2002. Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. [Theoretical and Applied Genetics 104:518–525](#)
139. Hood E. E. u. a., 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. [Journal of Bacteriology 168:1291-1301](#)
140. Hood E. E. u. a., 1999. Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. [Advances in experimental medicine and biology 464: 127-147](#)

141. Horsch R. B. u. a., 1984. Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. *Science* 223:496-498
142. Horsch R. B. u. a., 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231
143. Hou B. K. u. a., 2003. Chloroplast transformation in oilseed rape. [Transgenic Research 12:111-114](#)
144. Howard J. A., 2004. Commercialization of plant-based vaccines from research and development to manufacturing. [Animal Health Research Reviews 5: 243 - 245](#)
145. Hörlein G., 1994. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. [Reviews of environmental contamination and toxicology. 138: 73 - 145](#)
146. Huang S. u. a. 2004. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border Agrobacterium transformation vectors. [Transgenic Research 13: 451-461](#)
147. Huang Z. Y. u. a., 2004. Field and semifield evaluation of impacts of transgenic canola pollen on survival and development of worker honey bees. [Journal of economic Entomology 97:1517-1523](#)
148. IEA, 2014. [Key world energy statistics](#)
149. InBase, 2015. [InBase, The Intein Database and Registry](#)
150. ISAAA, 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. The first fourteen years, 1996 to 2009. [ISAAA Brief 41-2009: Executive Summary](#)
151. Ishida Y. u. a., 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. [Nature Biotechnology 14:745-750](#)
152. Ishikawa C. u. a., 2011. Functional Incorporation of Sorghum Small Subunit Increases the Catalytic Turnover Rate of Rubisco in Transgenic Rice. [Plant Physiology 156:1603-1611](#)
153. James C., 2015: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. [ISAAA Briefs](#). ISAA: Ithaca, NY.
154. Jassem M., 2000. Genetically modified sugar beets - survey of benefits, prospects and risks. [Electronic Journal of Polish agricultural universities 3\(2\):#01](#)
155. Joersbo M. u. a., 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. [Molecular Breeding 4: 111-117](#)
156. Kaltschmitt M. u. a., Hsg., 2009. Energie aus Biomasse - Grundlagen, Techniken und Verfahren. Springer. e-ISBN 978-3-540-85095-3
157. Kanazawa A. u. a., 2007: Epigenetic Inactivation of Chalcone Synthase-A Transgene Transcription in *Petunia* Leads to a Reversion of the Post-Transcriptional Gene Silencing Phenotype. [Plant and Cell Physiology 48:638-647](#)
158. Kanevski I. u. a., 1999. Plastome Engineering of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Tobacco to Form a Sunflower Large Subunit and Tobacco Small Subunit Hybrid. [Plant Physiology 119:133-141](#)
159. Karaman S. u. a., 2006. Analysis of immune response in young and aged mice vaccinated with corn-derived antigen against *E. coli* heat-labile enterotoxin. [Molecular Biotechnology 32: 31-42](#)
160. Karimi M. u. a., 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. [Trends in Plant Science 7:193-195](#)
161. Karimi M. u. a., 2013. Gateway vectors for transformation of cereals. [Trends in Plant Science 18:1-4](#)
162. Karnoup A. S. u. a., 2005. O-linked glycosylation in maize-expressed human IgA1. [Glycobiology 15: 965-981](#)
163. Kempe K. u. a., 2014. Split-gene system for hybrid wheat seed production. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 111:9097-9102](#)
164. Kercher M. A. u. a., 1997. Lac repressor-operator complex. [Current Opinion in Structural Biology 7:76-85](#)
165. Kim E. H. u. a., 2009. Chloroplast-targeted expression of synthetic cry1Ac in transgenic rice as an alternative strategy for increased pest protection. [Planta 230:397-405](#)
166. Klaus S. M. J. u. a., 2003. Rapid and proven production of transplastomic tobacco plants by restoration of pigmentation and photosynthesis. [The Plant Journal 35: 811-821](#)
167. Klaus S. M. J. u. a., 2004. Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. [Nature Biotechnology 22: 225-229](#)
168. Klein H. P., 2011. Biologie ohne fachwissenschaftliche Inhalte. Frankfurter Allgemeine Zeitung Nr. 28 S. 8, 28. Feb. 2011
169. Klein T. M. u. a., 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. [Proceedings of The National Academy of Sciences USA 85:4305-4309](#)
170. Klümper W. & Qaim M., 2014. A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. [PLoS ONE 9:e111629](#)
171. Ko T. S. u. a., 2006. Soybean (*Glycine max*) transformation using immature cotyledon explants. [Methods in Molecular Biology 343:397-405](#)
172. Kode V., 2005. The tobacco plastid accD gene is essential and is required for leaf development. [The Plant Journal 44, 237-244](#)
173. König A. u. a., 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. [Food and Chemical Toxicology 42:1047-1088](#)
174. Kunik T. u. a., 2001. Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98: 1871-1876](#)

175. Kuroda H. & Maliga P., 2002. Overexpression of the clpP 5'-Untranslated Region in a Chimeric Context Causes a Mutant Phenotype, Suggesting Competition for a clpP-Specific RNA Maturation Factor in Tobacco Chloroplasts. [Plant Physiology 129:1600-1606](#)
176. Lackey J., 2009. Biology of *Gossypium hirsutum*. Cotton biology facts. [CERA](#)
177. Landesregierung BW, 2013. [Pressemitteilung](#)
178. Lang P., 2009. Solar Power Realities Supply-Demand Characteristics – Storage and Capital Costs. [bravenewclimate.com by Barry Brook 2009](#)
179. Lange L. u. a., 2008. Construction and characterization of a sugar beet (*Beta vulgaris*) fosmid library. [Genome 51:948-951](#)
180. La Paz u. a., 2010. Stability of the MON 810 transgene in maize. [Plant Molecular Biology 74:563-571](#)
181. Lee L. J. & Ngim, J., 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. [Pest Management Science 56, 336 - 339](#)
182. Lennefors B. L. u. a., 2006. dsRNA-mediated resistance to Beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp *vulgaris*). [Molecular Breeding 18:313– 325](#)
183. Leonhard E., 2006. GM canola transforms the options for controlling weeds. [Ground Cover 62](#)
184. Li B. u. a., 2008. Heterologous expression of the TsVP gene improves the drought resistance of maize. [Plant Biotechnology Journal 6:146-159](#)
185. Li B. u. a., 2010. Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/FRT recombination system. [Journal of Biotechnology 145:206–213](#)
186. Li Z. u. a., 2007. A Cre/loxP-mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. [Plant Molecular Biology 65:329-341](#)
187. Liew P. S., Hair-Bejo M., 2015. Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their Applications for Disease Prevention in Animals. [Advances in Virology Volume 2015, Article ID 936940](#)
188. Liu F. u. a., 2014. Enhanced seed oil content by overexpressing genes related to triacylglyceride synthesis. [Gene 557:163–171](#)
189. Liu H. u. a., 2008. Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an Arabidopsis thaliana vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. [Plant, Cell and Environment 231:1325–1334](#)
190. Liu L., Fan X.-D., 2014. CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. [Plant Molecular Biology 85:209-218](#)
191. Liu S. J. u. a., 2008. The effect of co-cultivation and selection parameters on Agrobacterium-mediated transformation of Chinese soybean varieties. [Plant Cell Reports 27:489-498](#)
192. LIZ, 2008. [Landwirtschaftlicher Informationsdienst Zuckerrübe](#)
193. Llewellyn D. & Fitt G., 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi valley, Australia. [Molecular Breeding 2: 157-166](#)
194. Losey J. E. u. a., 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. [Nature 399:214](#)
195. Lucas D. M. u. a., 2007. Broiler Performance and Carcass Characteristics When Fed Diets Containing Lysine Maize (LY038 or LY038 × MON 810), Control, or Conventional Reference Maize. [Poultry Science 86:2152–2161](#)
196. Lucas M. L. u. a., 2004. Petition for Determination of Nonregulated Status for Lysine Maize LY038. Monsanto Company. [CERA](#)
197. Luo Z. X., Wu R. A., 1988. Simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. [Plant Molecular Biology Reporter 6:165–174](#)
198. Lv S. L. u. a., 2009. Overexpression of *Thellungiella halophila* H(+)-PPase (TsVP) in cotton enhances drought stress resistance of plants. [Planta 229:899-910](#)
199. Ma J. K. u. a., 1998. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. [Nature Medicine 4: 601-606](#)
200. MacGrann M., 2009. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. [Molecular Plant Pathology 10:129](#)
201. MacRae T. C. u. a., 2005. Laboratory and Field Evaluations of Transgenic Soybean Exhibiting High-Dose Expression of a Synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A Gene for Control of Lepidoptera. [Journal of Economic Entomology 98:577-587](#)
202. Mahon R. J. u. a., 2008. Isolations of Cry2Ab Resistance in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Are Allelic. [Journal of Economic Entomology 101:909-914](#)
203. Maiskomitee, 2011. [Deutsches Maiskomitee](#) e. V., Fachinfo.
204. Maliga P. & Bock R., 2011. Plastid Biotechnology: Food, Fuel, and Medicine for the 21st Century. [Plant Physiology 155:1501–1510](#)
205. Malvar T. & Glimer, A. J., 2000. Hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with broad-spectrum insecticidal activity. US Patent 6017534
206. Mannerlöf M. u. a., 1996. Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. [Euphytica 90:293–299](#)

247 Quellenverzeichnis

207. Mansoor S. u. a., 2006: Engineering novel traits in plants through RNA interference. [Trends in Plant Science 11: 559-565](#)
208. Mariani C. u. a., 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. [Nature 347:737-741](#)
209. Matthews G. A., & Tunstall J. P., 1994. Insect pest of cotton. C. A. B. International, Wallingford, England.
210. May G. E., 2011. Competing RNA secondary structures are required for mutually exclusive splicing of the Dscam exon 6 cluster. [RNA 17:222-229](#)
211. May M. u. a., 2003. Crop protection in sugar beet. [Pesticide Outlook 12:188-191](#)
212. Mehlo L. u. a., 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 102, 7812-7816](#)
213. Mellifera, 2015. [Bienen & Agrogentechnik](#)
214. Meyer, B., 2009. Brownfield AG News for America
215. Meyer, E., 2014. China - Two Rice Projects Of The Future Disappear - Or Do They? [Forbes Asia, August 2014](#)
216. MIR, 2008. Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, 2008. [Abschlußbericht Beizung und Bienenschäden](#).
217. MMDBa, 2015. NCBI Molecular Modeling Database. Zugangsnummer [73984](#)
218. MMDBb, 2015. ibidem, Zugangsnummer [51243](#)
219. Moar W. u. a., 2008. Field-evolved resistance to Bt toxins. [Nature Biotechnology 26:1072-1074](#)
220. Morris J. u. a., 2008. Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots. [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 105:1431-1435](#)
221. Möller B. L., 2005. Plant Biotechnology in Europe: A changing environment and landscape. [Trends in Plant Science 10:562-564](#)
222. Muranaka T., 2011. Plant Gateway vectors for RNAi as a tool for functional genomic studies. [Methods in Molecular Biology 744: 27-35](#)
223. Murphy & Hall 2010. Year in review-EROI or energy return on (energy) invested. [Annals of the New York Academy of Sciences. 1185:102-118](#)
224. Napoli C. u. a., 1990: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. [Plant Cell 2: 279 – 289](#)
225. Naqvi S. u. a., 2009. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 106:7762 – 7767](#)
226. Naqvi S. u. a., 2011. High-value products from transgenic maize. [Biotechnology Advances 29:40-53](#)
227. Nashawi I. S. u. a., 2010. Forecasting World Crude Oil Production Using Multicyclic Hubbert Model. [Energy & Fuels 24:1788-1800](#)
228. NTV, 2009. Gentechnikfreies Bayern. [Pressemitteilung](#)
229. OECD, 2008. Biofuel support policies: an economic assessment. [Paris: OECD; 2008](#)
230. OECDd, 2002. OECD Environment, Health and Safety Publications. [Consensus Document on the Biology of Beta vulgaris L. \(Sugar Beet\)](#)
231. OGTRa, 2002. Australian Government, Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator (OGTR). Risk Assessment and Risk Management Plan. Application for licence for dealings involving an intentional release into the environment. Title: [Commercial release of genetically modified \(InVigor® hybrid\) canola](#)
232. OGTRb, 2002. Australian Government Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator (OGTR). [The biology and ecology of Canola](#)
233. OGTRc, 2002. Australian Government Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator (OGTR). [The biology and ecology of cotton \(Gossypium hirsutum\) in Australia](#)
234. Ohta S. u. a., 2004. Expression of cold-tolerant pyruvate, orthophosphate dikinase cDNA, and heterotetramer formation in transgenic maize plants. [Transgenic Research 13: 475-485](#)
235. OISAT. Online Information Service for Non-Chemical Pest Management in the Tropics. [OISAT](#)
236. Okuzaki A. & Toriyama K., 2004. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. [Plant Cell Reports 22:509-512](#)
237. Pačurar D. I. u. a., 2011. Agrobacterium tumefaciens: From crown gall tumors to genetic transformation. [Physiological and Molecular Plant Pathology 76:76e81](#)
238. Paine J. A. u. a., 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. [Nature Biotechnology 23:482-487](#)
239. Palle S. R. u. a., 2013. RNAi-mediated Ultra-low gossypol cottonseed trait: performance of transgenic lines under field conditions. [Plant Biotechnology Journal 11:296-304](#)
240. PAN Pesticides Database. [PAN](#)
241. Park J. u. a., 2011. The impact of the EU regulatory constraint of transgenic crops on farm income. [New Biotechnology 28:397-406](#)
242. Pavli O. I. u. a., 2010. BNYVV-derived dsRNA confers resistance to rhizomania disease of sugar beet as evidenced by a novel transgenic hairy root approach. [Transgenic Research 19:915-922](#)

243. Pavli O. I. u. a., 2011. The hrpZ gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. [PLoS ONE 6: e17306](#)
244. Pavli O. I. u. a., 2012. High Level Resistance against Rhizomania Disease by Simultaneously Integrating Two Distinct Defense Mechanisms. [PLOS ONE 7:e51414](#)
245. PDBa, 2015. Protein Data Bank. Zugangsnummer [1LBG](#)
246. PDBb, 2015. ibidem. Zugangsnummer [1RXO](#)
247. Pen J. u. a., 1993. Phytase-containing Transgenic Seeds as a Novel Feed Additive for Improved Phosphorus Utilization. [Nature Biotechnology 11:811-814](#)
248. Perlak F. J. u. a., 2001. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA - early promises versus today's reality. [The Plant Journal 27:489-501](#)
249. Phipps R. H. & Park J. R. 2002. Environmental Benefits of genetically modified crops - Global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *Journal of Animal and Feed Sciences* 11:1-18
250. Pitzschke A. & Hirt H., 2010. New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. [The EMBO Journal 29:1021-1032](#)
251. Potrykus, I., 2008. Golden Rice - from Idea to Reality. Bertebos Conference 2008 - The Golden Rice. Falkenberg, Schweden
252. Potrykus I. u. a., 2008. Golden Rice and other biofortified food crops for developing countries - challenges and potential. Report from the Bertebos Conference in Falkenberg, Sweden, 7-9 September 2008. ISBN 978-91-85205-82-0
253. Raboy V., 2007. The ABCs of low-phytate crops. [Nature Biotechnology 25:874-875](#)
254. Radhakrishnan P. & Srivastava V., 2005. Utility of the FLP-FRT recombination system for genetic manipulation of rice. [Plant Cell Reports 23:721-726](#)
255. Ramessar K. u. a., 2008. Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 105: 3727-3732](#)
256. Rang C. u. a., 2004. Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. [Current Microbiology 49: 22-27](#)
257. Rao A. Q., 2011. Overexpression of the phytochrome B gene from *Arabidopsis thaliana* increases plant growth and yield of cotton (*Gossypium hirsutum*). [Journal of Zhejiang University-SCIENCE B \(Biomedicine & Biotechnology\). 12:326-334](#)
258. Rathore K. S., u. a. 2012: Ultra-low gossypol cottonseed: generational stability of the seed-specific, RNAi-mediated phenotype and resumption of terpenoid profile following seed germination. [Plant Biotechnology Journal 10:174-183](#)
259. Reiser O., 2007. [Chemie im Alltag](#) - Medikamente. Insulin (2) - Lebensretter für Diabetiker
260. Reuters, 2016. Burkina Faso seeks \$84 million from Monsanto over GM cotton strain [Pressemeldung](#)
261. Rice M. E., 2015. [Entomology Image Gallery](#). Iowa State University, USA.
262. Ricroch A. u. a. (2010). Is the German suspension of MON810 maize cultivation scientifically justified? [Transgenic Research 19:1-12](#)
263. Ritsema T. & Smeekens S. 2003a. Fructans: beneficial for plants and humans. [Current Opinion in Plant Biology 6:223-230](#)
264. Ritsema T. & Smeekens S., 2003b. Engineering fructan metabolism in plants. [Journal of Plant Physiology 160:811-820](#)
265. Roque E. u. a., 2007. The PsEND1 promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. [Plant Cell Reports 26: 313-325](#)
266. Sainsbury F. u. a., 2012. Multimodal Protein Constructs for Herbivore Insect Control. [Toxins 2012:455-475](#)
267. Sandermann, H., 2006. Plant biotechnology: ecological case studies on herbicide resistance. [Trends in Plant Science 11: 324 -328.](#)
268. Sanvido O. u. a., 2006. Ecological impacts of genetically modified crops - Experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation. [ART-Schriftenreihe 1. ART, Zürich](#)
269. Sädler, H., 1996. [Pflanzen-genetik in der Landwirtschaft](#)
270. Scarth R., McVetty, P. B. E., 1999. Designer Oil Canola - A review of new food-grade Brassica oils with focus on high oleic low linoleic types. [10th International Rapeseed Congress. Canberra, Australia](#)
271. Schafer M. G. u. a., 2011. "The Establishment of Genetically Engineered Canola Populations in the U.S". [PLoS ONE | 10.1371/journal.pone.0025736](#)
272. Schopfer P. & Brennicke A., 2006. Pflanzenphysiologie. Heidelberg: Spektrum Akad. Verlag
273. Schwabe K., A. u. a., 2010. Der Westliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) – eine Gefahr für den europäischen Maisanbau. [Journal für Kulturpflanzen 62: 277-286](#)
274. Scott E. u. a., 2004. From Arabidopsis to agriculture: engineering improved Vitamin E content in soybean. [Trends in Plant Science 9:365-367](#)
275. Séralini G.-E., 2007. New Analysis of a Rat Feeding Study with a Genetically Modified Maize Reveals Signs of Hepatorenal Toxicity. [Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52:596-602](#)

276. Sévenier R. u. a., 1998. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. [Nature Biotechnology 16:843–846](#)
277. Shaw A. J., 2000. Cotton pest Management guide 2000/2001. Cotton Technical Specialist, NSW Agriculture
278. Shi J. u. a., 2007. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. [Nature Biotechnology 25:930-937](#)
279. Shin S. u. a., 2008. Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. [Journal of Experimental Botany 59:2371-2378](#).
280. Shinozaki K. u. a., 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome. [Plant Molecular Biology Reporter 4:111-148](#).
281. Shou H. u. a., 2004. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. [Journal of Experimental Botany 55: 1013 - 1019](#)
282. Shrawat A. K. & Lörz, H., 2006. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. [Plant Biotechnology Journal 4:575-603](#).
283. SIGNAL, 2014. [Salk Institute Genomic Analysis Laboratory](#)
284. Soberón M. u. a., 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. [Science 318:1640-1642](#)
285. Spiroux de Vendômois J. u. a., 2009. A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health. [International Journal of Biological Sciences 5: 706-726](#)
286. Stanley-Horn D. E. u. a., 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 98: 11931-11936](#)
287. Statista, 2013. [Höhe der CO2-Emissionen in Deutschland](#)
288. Steinke K. u. a., 2010. Effects of long-term feeding of genetically modified corn (event MON810) on the performance of lactating dairy cows. [Journal of animal physiology and animal nutrition 94:e185–e193](#)
289. Stoger E. u. a., 2005. Recent progress in plantbody technology. [Current pharmaceutical design. 11: 2439 -2457](#)
290. Strasburger E. u. a., 1991. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen S. 352 f. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. ISBN 3-437-20447-5
291. Streatfield S. J. u. a., 2004. Analysis of the maize polyubiquitin-1 promoter heat shock elements and generation of promoter variants with modified expression characteristics. [Transgenic Research 13: 299-312](#)
292. Sundberg U., Silversides C. R., Hsg., 1996. Operational Efficiency in Forestry. Vol. I: Analysis. Kluwer, Dordrecht, NL. ISBN 90-247-3683-8
293. Sunilkumar G., 2006. Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103:18054-18059](#)
294. Svab Z. u. a., 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87: 8526–8530](#)
295. Tabashnik B. E. u. a., 2008a. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. [Nature Biotechnology 26:199-202](#)
296. Tabashnik B. E. u. a., 2008b. Field-evolved resistance to Bt-Toxins. [Nature Biotechnology 26:1074-1076](#).
297. Tacket C. O u. a., 2009. Plant-Based Oral Vaccines: Results of Human Trials. [Current Topics in Microbiology and Immunology 332:103-117](#)
298. Tamada T. & Baba T., 1973. Beet necrotic yellow vein virus from Rhizomania affected sugar beet in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan 39:325–332
299. Tamás-Nyitrai C. u. a., 2012. Biolistic- and Agrobacterium-mediated transformation protocols for wheat. [Methods in Molecular Biology 877:357-84](#)
300. Tan S. u. a., 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. [Pest Management Science 61: 246-257](#)
301. Tanaka Y. u. a., 2012. Gateway Vectors for Plant Genetic Engineering: Overview of Plant Vectors, Application for Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) and Multigene Construction. [Genetic Engineering - Basics, New Applications and Responsibilities, Barrera-Saldaña H. A. \(Ed.\), ISBN: 978-953-307-790-1, InTech](#)
302. Tavva V. S. u. a., 2007. Increased alpha-tocopherol content in soybean overexpressing the *Perilla frutescens* gamma-tocopherol methyltransferase gene. [Plan Cell Reports 26:61-70](#)
303. Taylor T. C. & Andersson I., 1997. The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. [Journal of Molecular Biology 265:432](#)
304. [The Golden Rice Project](#)
305. Tougou M. u. a., 2006. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus. [Plant Cell Reports 25:1213-1218](#)
306. Tougou, M. u. a., 2007. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene. [Plant Cell Reports 26:1967-1975](#)
307. Transgen, 2016a. [Die Industriestärke-Kartoffel Amflora: Langes Zulassungsverfahren, kurzes Ende](#)
308. Transgen, 2016b. [Eiweißlücke bei Futtermitteln: Europa ist von Sojaimporten abhängig](#)
309. Transgen, 2016c. Gentechnisch veränderte Zuckerrüben: Anbauflächen weltweit. [Transgen](#)
310. Trewavas A., 2004. A critical assessment of organic farming-and-food assertions with particular respect to the UK and the potential environmental benefits of no-till agriculture. [Crop Protection 2004:757-781](#)

311. Tungschat-Huang T. u. a., 2011. Visual spectinomycin resistance (aadAau) gene for facile identification of transplastomic sectors in tobacco leaves. [Plant Molecular Biology 76:453–461](#)
312. Turk S. u. a., 1997. The vacuolar sorting domain of sporamin transports GUS, but not levansucrase, to the plant vacuole. [New Phytologist 136: 29–38](#)
313. Tuteja J. H. u. a., 2009. Endogenous, Tissue-Specific Short Interfering RNAs Silence the Chalcone Synthase Gene Family in Glycine max Seed Coats. [The Plant Cell 21: 3063–3077](#)
314. Tyldesley J. B., 1973. Long range transmission of tree pollen to Shetland. 1. Sampling and Trajectories. [New Phytologist 72:175-181](#)
315. Ufop, 2014. [Union zur Förderung von Öl- und Proteinpflanzen e. V.](#)
316. Umbeck P. F. u. a., 1991. Degree of Pollen Dispersal by Insects from a Field Test of Genetically Engineered Cotton. [Journal of Economic Entomology 84:1943-1950](#)
317. US Census Bureau, 2014. [International Data Base](#)
318. USDA, 2016. [United States Department of Agriculture, Economic Research Service](#)
319. Van der Krol A. R. u. a., 1990: Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. [Plant Cell 2: 291 – 299](#)
320. Van Eenennaam A. L. u. a., 2003. Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. [Plant Cell 15: 3007-3010](#)
321. VanGessel M. J., 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. [Weed Science 49: 703 - 705.](#)
322. Volkmann G. & Mootz H. D., 2013. Recent progress in intein research: from mechanism to directed evolution and applications. [Cellular and Molecular Life Sciences 70:1185–1206](#)
323. VSZ, 2015. [Verband Süddeutscher Zuckerrübenanbauer e. V.](#)
324. Wan P. u. a., 2012. Increased Frequency of Pink Bollworm Resistance to Bt Toxin Cry1Ac in China. [PLoS One. 2012; 7\(1\): e29975](#)
325. Wang J. u. a., 2005. Novel insect resistance in Brassica napus developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. [Plant Cell Reports 24: 549-555](#)
326. Wang S. u. a., 2008. Bt-cotton and secondary pests. [International Journal of Biotechnology 10:113-121](#)
327. Wang Y. & Yau Y.-Y., 2011. Recombinase technology: applications and possibilities. [Plant Cell Reports 30:267–285](#)
328. Wakasugi u. a., 1998. Updated Gene Map of Tobacco Chloroplast DNA. [Plant Molecular Biology Reporter 16:231-241](#)
329. Warwick S. I. u. a., 2003. Hybridization between transgenic Brassica napus L. and its wild relatives: Brassica rapa L., Raphanus raphanistrum L., Sinapis arvensis L. and Erucastrum gallicum (Willd.) OE Schulz. [Theoretical and Applied Genetics 107: 528–539](#)
330. Wei A. I. u. a., 2011. The pyramid of transgenes TsVP and BetA effectively enhances the drought tolerance of maize plants. [Plant Biotechnology Journal 9:216–229](#)
331. Wei Z. M. u. a., 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen Erwinia amylovora. [Science 257:85-88](#)
332. Weißbach D. u. a., 2013. Energy intensities, EROIs, and energy payback times of electricity generating power plants. [Energy 52:210-221](#)
333. Weng, L.-X. u. a., 2011. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified cry1Ac provide effective control against stem borers in field trials. [Transgenic Research 20:759-772](#)
334. Weyens G. u. a., 2004. Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. [Plant Biotechnology Journal 2:321-327](#)
335. Whitney S. M. u. a., 2011. Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature's CO₂-Sequestering Enzyme, Rubisco. [Plant Physiology 155:27–35](#)
336. Williams G. M. u. a., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. [Regulatory Toxicology and Pharmacology 31:117-65](#)
337. Wright T. R. u. a., 2010. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. [Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 107:20240-20245](#)
338. Wu G. u. a., 2005. Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. [Nature Biotechnology 23: 1013-1017](#)
339. Wu H. u. a., 1998a. Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein. [Biochimica et Biophysica Acta 1387:422-432](#)
340. Wu H. u. a., 1998b. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95:9226-9231](#)
341. Wu J. u. a., 2011. Development of insect-resistant transgenic cotton with chimeric TVip3A* accumulating in chloroplasts. [Transgenic Research 20:963-973](#)
342. Yang A. u. a., 2009. Ovary-drip transformation: a simple method for directly generating vector- and marker-free transgenic maize (Zea mays L.) with a linear GFP cassette transformation. [Planta 229:793–801](#)
343. Yang A. F. u. a., 2005. Efficient transformation of beet (Beta vulgaris) and production of plants with improved salt-tolerance. Plant Cell, [Tissue and Organ Culture 83, 259–270](#)

251 Quellenverzeichnis

344. Yu J. u. a., 2005. Seed-specific expression of the lysine-rich protein gene sb401 significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. [Food and nutrition bulletin 26\(4\): 427-431](#)
345. Yue Y. u. a., 2012. Overexpression of the AtLOS5 gene increased abscisic acid level and drought tolerance in transgenic cotton. [Journal of Experimental Botany 63:3741-3748](#)
346. Yusuf M. A. & Sarin N. B., 2007. Antioxidant value addition in human diets: genetic transformation of Brassica juncea with gamma-TMT gene for increased alpha-tocopherol content. [Transgenic Research 16:109-113](#)
347. Zale J. M., 2009. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in Agrobacterium tumefaciens. [Plant Cell Reports 28:903-913](#)
348. Zechner E. u. a., 2011. Ertrag versus Qualität - hat die Ethanolgetreidezüchtung Zukunft? 61. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2010, 73-77. ISBN: 978-3-902559-53-1
349. Zhang H.-X. u. a., 2001. Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. [Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98: 12832-12836](#)
350. Zhang W. u. a., 2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (Zea mays L.) plants. [Theoretical and Applied Genetics 107: 1157-1168](#)
351. Zhang M. u. a., 2011. Spatiotemporal manipulation of auxin biosynthesis in cotton ovule epidermal cells enhances fiber yield and quality. [Nature Biotechnology 29:453-458](#)
352. Zhang Y. S. u. a., 2005. Stability of inheritance of transgenes in maize (Zea mays L.) line produced using different transformation methods. [Euphytica 144:11-22](#)
353. Zhao J. H. u. a., 2010. Benefits of Bt cotton counterbalanced by secondary pests? Perceptions of ecological change in China. [Environmental Monitoring and Assessment 173:985-994](#)
354. Zhou M. & Luo H., 2013. MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. [Plant Molecular Biology 83:59-75](#)
355. Zhu T. u. a. 2000. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. [Nature Biotechnology 18: 555 - 558](#)